

## Tesis de Posgrado

# Modulación de oncogenes en cancer mamario humano

Mladovan, Alejandro G.

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Mladovan, Alejandro G.. (1996). Modulación de oncogenes en cancer mamario humano. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2837\\_Mladovan.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2837_Mladovan.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Mladovan, Alejandro G.. "Modulación de oncogenes en cancer mamario humano". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2837\\_Mladovan.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2837_Mladovan.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

*Universidad de Buenos Aires*

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*

*Departamento de Química Biológica*

**Tesis Doctoral**

**MODULACION DE ONCOGENES  
EN CANCER MAMARIO HUMANO**

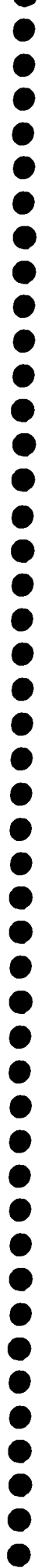
**AUTOR: Alejandro G. Mladovan**

**DIRECTOR: Dr. Alberto Baldi**

*Instituto de Biología y Medicina Experimental (CONICET)*

**-1996-**

h.2



*Universidad de Buenos Aires*

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*

*Departamento de Química Biológica*

**Doctoral Thesis**

**MODULATION OF ONCOGENES  
IN HUMAN BREAST CANCER**

**AUTHOR: Alejandro G. Mladovan**

**DIRECTOR: Dr. Alberto Baldi**

*Instituto de Biología y Medicina Experimental (CONICET)*

**-1996-**

•



## **PALABRAS CLAVES**

oncogenes

c-fos

c-myc

EGF

ésteres de forbol

TGFbeta

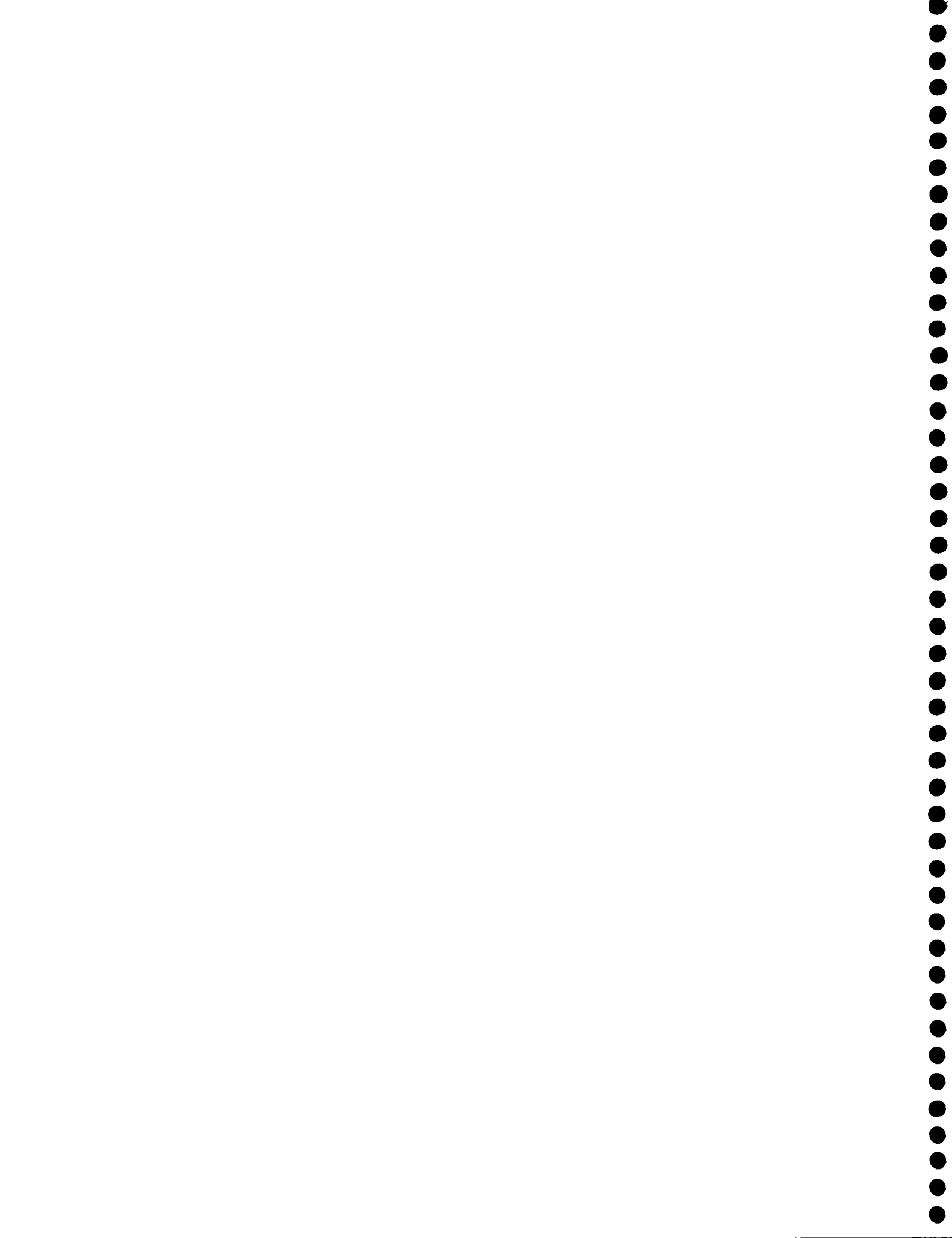
cáncer de mama

líneas celulares

proliferación

MCF-10A

MCF-10T



## KEYWORDS

oncogenes

c-fos

c-myc

EGF

phorbol esters

TGFbeta

breast cancer

cell growth

cell lines

MCF-10A

MCF-10T





*A mis padres*



	<i>Indice</i>	1
<hr/>		
1. RESUMEN		5
2. SUMMARY		9
3. AGRADECIMIENTOS		11
4. ABREVIATURAS, ACRONIMOS Y CONVENCIONES		13
5. INTRODUCCION		17
5.1. Cáncer de mama		18
5.2. Oncogenes: una retrospectiva de su descubrimiento		19
5.3. Definición de oncogén		22
5.4. Activación de los oncogenes		22
5.5. Clasificación de los oncogenes		23
5.6. Proto-oncogenes que codifican para proteínas nucleares		25
5.6.1. Familia de genes <i>myc</i>		26
5.6.2. Familia de genes <i>fos</i>		28
5.6.3. Familia de genes <i>jun</i>		29
5.6.4. AP-1, la conexión Jun-Fos		30
5.7. Familia de proteínas Ras		32
5.8. Familia del receptor de EGF		34
5.9. Proteínas kinasas Activadas por Mitógenos (MAPk)		35
5.10. Vía de las MAPk		37
6. MODELO DE TRABAJO		41
7. MATERIALES Y METODOS		43
7.1. Materiales utilizados		43
7.2. Cultivo de líneas celulares		43
7.3. Análisis de la proliferación celular		45
7.4. Incorporación de timidina		46
7.5. Estudio de la expresión de proto-oncogenes		47
7.5.1. Obtención del ARN		48
7.5.2. Transferencia del ARN a membranas		48
7.5.3. Marcación radiactiva de las sondas		49

## 2 *Indice*

---

7.5.4. Hibridización del ARN	50
7.6. Sondas utilizadas	50
7.7. Obtención de plásmidos	51
7.8. Ensayo cuantitativo de los sitios de unión del EGF	53
7.9. Análisis de la activación de MAPk	53
7.10. Ensayo de Western Blot	54
7.11. PCR del gen <i>H-ras</i>	54
7.12. Análisis y representación gráfica de las autoradiografías	55
8. <b>RESULTADOS</b>	57
8.1. Caracterización celular y molecular de las líneas MCF-10A y MCF-10T	57
8.2. Estudio del nivel de proteínas supresoras tumorales en líneas celulares de mama humana.	63
8.3. Estudios de proliferación de diversas líneas celulares provenientes de tejido mamario humano.	64
8.4. Influencia de diversos agentes sobre la proliferación de las líneas celulares MCF-10A y MCF-10T	66
8.5. Estudio de la expresión de proto-oncogenes nucleares en las líneas celulares MCF-10A y MCF-10T	68
8.6. Cinética de activación de proto-oncogenes nucleares	71
8.7. Análisis de la expresión del proto-oncogén <i>c-fos</i> bajo la acción de diversos agentes	76
8.8. Estudio particular del efecto del EGF	78
8.8.1. Proliferación	78
8.8.2. Ensayos de dosis-dependencia del EGF en la inducción de la síntesis de ADN	80
8.8.3. Expresión de <i>c-fos</i> -- Dependencia del EGF	80
8.9. Efecto de diversos agentes sobre la acción del EGF	82
8.9.1. 1) Proliferación	82
8.9.2. Regulación de los niveles de ARNm de proto-oncogenes nucleares	83
8.10. Efecto de inhibidores de kinasas en la expresión de proto-oncogenes nucleares	84

8.11. Regulación del gen <i>c-myc</i> _____	87
8.12. Efecto del TGFβ1 en la expresión del gen <i>c-myc</i> _____	90
8.13. Efecto del PMA sobre la proliferación de líneas celulares de mama _____	93
8.14. Efecto del PMA en la unión de EGF a su receptor _____	94
8.15. Determinación de la activación de MAPk y fosforilación en tirosina del receptor de EGF _____	96
<b>9. DISCUSION</b> _____	<b>101</b>
9.1. Caracterización de las líneas celulares MCF-10A y MCF-10T _____	101
9.1.1. Caracterización morfológica _____	102
9.1.2. Caracterización molecular _____	104
9.1.3. Proliferación libre de anclaje _____	104
9.2. Análisis de proteínas codificadas por genes supresores tumorales _____	105
9.3. Estudio de la proliferación de diversas líneas celulares de mama humana _____	105
9.4. Expresión de proto-oncogenes nucleares en MCF-10A y MCF-10T _____	109
9.5. Rol del EGF en las líneas celulares MCF-10A y MCF-10T _____	112
9.6. Expresión de proto-oncogenes y proliferación - Modulación de la estimulación por EGF _____	113
9.7. Expresión del proto-oncogén <i>c-myc</i> _____	116
9.8. TGFβ como agente inhibitorio de proliferación - Regulación de <i>c-myc</i> _____	117
9.9. PMA y proliferación celular _____	118
9.10. Análisis de la activación de MAPk _____	121
9.11. Efecto de inductores de cAMP sobre la proliferación y la actividad de MAPk _____	122
<b>10. CONCLUSIONES</b> _____	<b>125</b>
<b>11. BIBLIOGRAFIA</b> _____	<b>127</b>



## 1. RESUMEN

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en el sexo femenino afectando en la actualidad a una de cada diez mujeres. La complejidad de esta patología y el escaso conocimiento acerca de su etiología y desarrollo dificultan el entendimiento fisiopatológico de dicho desorden y, por consiguiente, la prevención y el tratamiento. Los estudios diferenciales sobre la proliferación y los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de duplicación celular en células normales y neoplásicas aportan nuevas ideas para la comprensión del desarrollo de esta enfermedad.

En tal sentido, los trabajos realizados en la presente Tesis tuvieron como principal objetivo estudiar diversos parámetros involucrados en la proliferación de células mamarias humanas bajo la acción de hormonas peptídicas y de agentes que actúan como promotores tumorales. De la amplia gama de señales moleculares se analizaron especialmente aquellas relacionadas con la expresión de proto-oncogenes nucleares y la activación de ciertas kinasas que participan en la vía de señales que regulan la expresión de dichos genes.

Estos estudios se realizaron utilizando como modelo de trabajo diversas líneas celulares, principalmente la línea no tumorigénica establecida a partir de tejido mamario humano normal, MCF-10A, su contraparte transformada con el oncogén *H-ras*, MCF-10T y líneas neoplásicas de mama humana ampliamente descriptas en la literatura como MCF-7, MDA-453 y SKBR3.

La caracterización celular y molecular de MCF-10T evidenció la presencia de un gen *H-ras* mutado en el codón 12 y la sobre-expresión de dicho gen. Si bien se comprobó que MCF-10T es capaz de proliferar en forma independiente del anclaje, su duplicación es inhibida por la alta densidad celular siendo incapaz de proliferar en forma estratificada.

Las células provenientes de tejido normal evidenciaron una tasa proliferativa mayor que las de origen neoplásico en condiciones de cultivo favorable, mientras que células no transformadas como las MCF-10A no sobreviven en ausencia de nutrientes. De los agentes que promueven la proliferación en células MCF-10, el EGF ejerció un potente efecto



mitogénico seguido por el IGF-I y la insulina a altas dosis. Los estudios determinaron que en estas células el EGF y el PMA, pero no la insulina o el IGF-I, son capaces de aumentar los niveles de ARNm del gen *c-fos*. Los estudios demostraron que el EGF y el PMA inducen la expresión de los proto-oncogenes *c-fos*, *c-jun*, *fosB* y *junB* con cinéticas particulares para cada gen no mostrando diferencias significativas entre las células MCF-10A y MCF-10T, siendo válida esta observación para los dos agentes analizados. Otros genes como *c-myc*, *junD* o *fra1*, evidenciaron escasa variación en sus niveles de transcritos ante dichos estímulos. Si bien ambas líneas exhibieron una dosis dependencia del EGF en cuanto a su proliferación, inducción de la síntesis de ADN y expresión de proto-oncogenes nucleares, la línea transformada MCF-10T manifestó un menor requerimiento de nutrientes y una mayor sensibilidad a otros mitógenos comparado con MCF-10A, posiblemente debido a una mayor proliferación autócrina.

La combinación del EGF con otros agentes estudiados promueve un mayor efecto proliferativo que el ejercido por cada uno de ellos individualmente sin afectar los niveles de transcritos de proto-oncogenes nucleares inducidos por el EGF.

Se comprobó que el EGF ejerce su acción inductora sobre los proto-oncogenes nucleares a través de la autofosforilación de su receptor específico con la subsecuente activación de MAP kinasas involucradas en la cascada de señales mitogénicas. Se observó además, que las diversas líneas celulares analizadas difieren cuantitativamente en los tipos de MAP kinasas que expresan según su origen normal o neoplásico. Esto establece un hecho relevante por cuanto podría inferirse que tales especies constituyen marcadores específicos de desórdenes asociados al tipo de neoplasia analizado. Si bien la acción de agentes que inducen la formación del segundo mensajero AMPc resultan inhibitorios de la proliferación en ciertas líneas celulares de mama, en ningún caso estos agentes, o drogas que mimetizan la acción del AMPc, bloquearon la activación de MAP kinasas mediada por el EGF como se ha descrito en otros sistemas celulares.

Por último, el gen *c-myc*, cuyos transcritos se encuentran elevados en las células MCF-10A y MCF-10T durante su crecimiento exponencial o en estadio de quiescencia, no solo es regulado por agentes mitogénicos como el EGF, sino también por las condiciones

extracelulares (densidad celular y factores de crecimiento autócrinos) y por agentes inhibitorios de la proliferación como el TGF $\beta$ 1.

Por lo tanto se ha demostrado que la transformación *in vitro* de células de mama normales por el oncogén *H-ras*, a diferencia de lo que ocurre en otros modelos celulares, altera en forma pleiotrópica diversas funciones celulares relacionadas con el proceso neoplásico, como el crecimiento en ausencia de sustrato de anclaje, requerimiento de nutrientes y diversos cambios morfológicos, sin afectar ciertos mecanismos involucrados en la respuesta primaria que conducen a la duplicación celular como la inducción de proto-oncogenes nucleares o la activación de la vía de MAP kinasas. Asimismo, se deduce que el proceso neoplásico difícilmente pueda ser atribuido a la alteración de un solo gen; resulta más adecuado sugerir que tales desórdenes son consecuencia de un número mayor de fenómenos que actúan en forma coordinada para desarrollar todo su potencial neoplásico.

Es mi más firme deseo que los estudios detallados en esta Tesis puedan contribuir de alguna forma al entendimiento de la patogenia y el desarrollo de las enfermedades neoplásicas que afectan al ser humano.



## 2. SUMMARY

Breast cancer is the most frequent female tumor affecting at present one out of ten women. The complexity of this pathology and our limited knowledge of its etiology and biology hinder the understanding, prevention and treatment of the disease. Studies on the proliferation and molecular mechanisms involved in cell division from both normal and neoplastic cell lines would contribute with new insights in the the development of this affliction.

In this sense, the aim of this Thesis was to study several parameters involved in the proliferation of human mammary cells exposed in culture to peptide hormones and tumor promoters. Among the broad range of molecular signals, those involved with the expression of proto-oncogenes and related kinases that regulates this process, were analyzed.

These studies were carried out on several cell lines, namely MCF-10A, established from normal human breast tissue; MCF-10T, the same line transformed with an *H-ras* oncogene and several well-known neoplastic human breast cell lines: MCF-7, MDA-453 and SKBR3.

The cellular and molecular characterization of MCF-10T showed the presence of the *H-ras* gene mutated in codon 12 and its overexpression. Although MCF-10T is capable of anchorage-independent growth, its duplication is inhibited by high cell density and cannot proliferate in a stratified fashion.

Cells from normal tissue displayed a higher growth rate than those from neoplastic sources in a suitable culture condition, but non-tumorigenic cells, as MCF-10A cannot survive in the absence of appropriate growth factors. From the proliferating agents studied on MCF-10A and MCF-10T cells, EGF exerted the most potent mitogenic effect, followed by IGF-I and insulin at high dose. Both EGF and PMA, but neither IGF-I nor insulin, were able to modify *c-fos* mRNA levels. Studies demonstrated that EGF and PMA induced the expression of *c-fos*, *c-jun*, *fosB* and *junB* with a particular kinetic for each gene without any significant differences between MCF-10A and MCF-10T nor among EGF and PMA. Other genes, such as *c-myc*, *junD* or *fra-1* showed only a poor variation in its transcript levels with those stimuli. Although growth rate, DNA synthesis and proto-oncogene induction were

dependent on the EGF concentration in both lines, the transformed MCF-10T cell line exhibited a lower requirement for nutrients and an increased sensitivity to other mitogens, probably due to an autocrine proliferation.

The association of EGF with other agents increased the proliferative effect exerted by each agent alone, without affecting the proto-oncogene mRNA levels induced by EGF.

EGF exerts its action on nuclear proto-oncogenes through autophosphorylation of its specific receptor with the subsequent activation of MAP kinases. Each cell line expressed different classes of MAP kinases, according to their normal or neoplastic origin. This constitutes a significant finding, as it could be inferred that such species make up specific markers associated to the type of neoplasia analyzed. Though cAMP inducing agents inhibit proliferation of certain mammary cell lines, this action is not mediated through the control of MAP kinase activity as it was widely described in other systems.

*c-myc* gene, whose transcripts are elevated in both proliferating and quiescent MCF-10 cells, is regulated by mitogens such as EGF and also by extracellular conditions (cellular density and autocrine factors) and TGF $\beta$ 1, an inhibitor of cell growth.

Thus, *in vitro* transformation of breast cells with an activated *H-ras* gene alters in a pleiotropic mode several cellular functions associated to the neoplastic process, such as independent-anchorage growth, nutrient requirement and morphological changes. However, it does not affect those mechanisms involved in the early responses which trigger cell duplication, such as the induction of nuclear proto-oncogenes or activation of MAP kinases. Therefore, these results suggest that the neoplastic process cannot be attributed to the alteration of only one gene; instead, it would be more adequate to consider this disease as a consequence several events acting in coordination to fulfill their neoplastic potential.

I hope the studies analyzed in this Thesis could contribute in part to the understanding of the pathogenesis and development of the neoplastic disease affecting the human being.

### **3. AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a las siguientes personas e instituciones, sin cuyo apoyo hubiera sido imposible realizar esta Tesis.

A mis padres, por todo lo que me dieron.

Al Dr. Alberto Baldi, por recibirme en su laboratorio, brindándome su apoyo incondicional en mis aventuras (y desventuras) científicas y su entusiasmo y amistad más allá de los resultados propicios o adversos.

A todos mis compañeros de laboratorio, Carina Shayo, Ethel Palavecino, Nestor Annibali, Martín Crespi, Marcela Ortiz, Pablo Mateos, Gabriela Sansó, Verónica Grüntzing, Laura Bocanera, Silvia Sobrado, Gabriela Vecchieti, Martha Amor y Miriam Zommer por su ayuda desinteresada y su amistad a pesar de haberme soportado los meses o años que compartieron conmigo el trabajo de laboratorio.

A Leonardo Bussmann, Lino Baraño, Patricia Zaragüeta, Alejandro Colman Lerner, Guillermo Lanuza, Micky Bley, Silvia Lugo, María Laura Fiscman y Eugenia Chiape, por su compañerismo, generosidad y las discusiones útiles sobre temas y técnicas que desconocía.

A Juan C. Calvo, por ayudarme en la “digitalización” de las figuras de esta Tesis y a Omar Pignataro, por ayudarme a entrar al IBYME y empezar mi carrera científica (todavía me pregunto si se lo tengo que agradecer?)

A Roxana Schillaci, Mariana Brocardo, Silvia Gogg y Alicia Roldán, por compartir y amenizar tantos mediodías.

Al IBYME y a todos sus miembros, por su colaboración en la realización de este trabajo.

Al los integrantes del INGEBI, por brindarme sus instalaciones y ayuda cada vez que lo necesité. En particular quisiera agradecer a Mercedes Goin por las discusiones sobre proliferación celular y al laboratorio 211, tanto el “viejo” (EGGS): Erick Grotewold, Danny Altschuler y Guillermo Taccioli, por el apoyo brindado en mis primeros pasos en la biología molecular; como el “nuevo” (PAPA): Fernando Bravo, Florencia Rodriguez, Gaby Calamante, etc. por sus consejos técnicos y por ofrecerme sus equipos y enzimas cuando lo necesité. A Alberto Kornblihtt y su grupo, por el plásmido con *gapdh* y la colaboración brindada.

A LALCEC y al CONICET, por el apoyo manifestado a través de sus becas en las distintas etapas de esta Tesis.

#### **4. ABREVIATURAS, ACRONIMOS y CONVENCIONES**

2-MeOH: 2 mercapto etanol

A600: absorbancia a 600nm

ADN: ácido. desoxiribonuceico

AMPc: adenosina 3',5'-monofosfato

ARN: ácido. ribonucleico

ARNm: ácido. ribonucleico, mensajero

bp: pares de bases

BPB: azul de bromofenol

BR: Región basica (sequencia de aminoácidos)

BrEtd: bromuro de etidio

BSA: sero albúmina bovina

CT: toxina colérica

DiBuAMPc: dibutiril AMPc

DiMePOPOP: 1,4-bis-(4-metil-5-fenil-2-oxazoil)benceno

DME/F12: medio Eagle modificado por Dulbecco: mezcla nutriente de Ham F-12 1:1

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTPs: deoxinucleótidos trifosfato

EC<sub>50</sub>: Dosis que provoca una estimulación del 50% respecto del valor máximo.

EDTA: ácido. etilendiamino tetraacético, sal disódica

EGF: factor de crecimiento epidérmico

rEGF: rceptor para el factor de crecimiento epidérmico

EGTA: ácido. etilénglicol- bis (β-aminoetil eter) tetraacético, sal sódica

FCS: suero fetal bovino



## 14 *Abreviaturas*

---

*gapdh*: gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

HC: hidrocortisona

HLH: estructura aminoácídica (hélice-vuelta-hélice)

hs: horas

HS:suero equino

iAC: alcohol isoamílico:cloroformo 1:24

IC<sub>50</sub>: Dosis que provoca una inhibición de la proliferación del 50% respecto del valor control.

IGF-I: factor de crecimiento similar a insulina (tipo I)

IM: índice mitótico

Kb: 1000 bp

Kdal: 1000 dalton (1 dalton equivale a la masa de un mol)

LB: Luria Broth (Bacto-tryptona 5 g/l, extracto de levadura 10 g/l, NaCl 10 g/l)

LZ: cierre de leucinas (estructura aminoácídica)

MAPk: proteína kinasa activada por mitógenos

medio BSA: DME/F12 suplementado con 1 mg/ml de BSA

medio HS: DME/F12 suplementado con 5% de suero equino y antibiótico

min: minutos

MLS: medio libre de suero y proteínas

PBS: buffer fosfato salino

PDGF:factor de crecimiento derivado de plaquetas

PMA: 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (también conocido como TPA)

PMSF: p-metilen sulfonil fluoruro

PPO: 2,5-difeniloxazol

SDS: dodecil sulfato de sodio

SRE: Elemento de respuesta al suero

SSC: solución salina citrato (20X = 3 M NaCl, 0.3 M citrato de sodio, pH 7)

TAE: Tris-acetato 0.04 M pH 8, 1mM EDTA

TBS-T: 20mM Tris-HCl pH 7.6 , 137 mM NaCl y 0.2%Tween20

TE: 10 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM EDTA

TEN 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA y 100 mM NaCl

TGF: factor de crecimiento tumoral

TPA: ver PMA

TRE: Elemento de respuesta al TPA (PMA)

XC: xilen cianol

Se utilizará la convención de denotar al producto proteico de un gen colocando en mayúscula la primer letra de la designación del gen, así, c-Jun es la proteína codificada por el gen *c-jun*.

Los genes se denotarán en *itálicas*.

A los fines de esta Tesis, los términos inducción o expresión de un gen se referirán a la variación en los niveles de ARNm en estado estacionario para dicho gen sin considerar si tales variaciones obedezcan a cambios en la transcripción del gen o en la estabilidad del mensajero.



## 5. INTRODUCCION

Un organismo multicelular puede ser considerado como una sociedad o ecosistema cuyos miembros individuales, las células, se reproducen y organizan en forma de asociaciones colaborativas dando lugar a los tejidos. Éstos funcionan como sistemas ecológicos: hay nacimiento y muerte celular, concepto de hábitat, limitaciones territoriales, mantenimiento del tamaño de la población, etc. Sin embargo, un tópico ecológico obviamente ausente es el de la selección natural. Esto se debe a que un organismo está formado por una sociedad muy particular, en la cual el autosacrificio, más que la competencia, es la regla de toda jerarquía celular, excepto las germinales.

Es así que, en contraste con los organismos unicelulares como bacterias, levaduras, protozoarios, etc. los cuales compiten entre sí para sobrevivir, las células de un organismo multicelular están comprometidas a colaborar. Cualquier alteración que diera lugar a un comportamiento no altruista por parte de miembros individuales pondrá en peligro a toda la comunidad. La competencia y la selección natural, cuando operan dentro de una población de células somáticas, representan ingredientes para un desastre. Este tipo de alteración es el que ocurre, en esencia, en el cáncer: una enfermedad en la cual ciertas células individuales comienzan a proliferar en forma egoísta a expensas de sus vecinas, pero al final destruyen toda la sociedad celular y mueren.

Las células cancerosas se definen por dos propiedades heredables: se reproducen desafiando los controles normales y colonizan territorios normalmente reservados a otras células, una combinación que las convierte en componentes de una enfermedad particularmente severa. Una célula anormal aislada que no prolifera más que sus vecinas normales no causa un daño significativo, pero si su proliferación escapa a los mecanismos de control, dará lugar a un tumor o neoplasia. Mientras las células tumorales permanezcan agrupadas en una única masa compacta, se considera al tumor como benigno; por el contrario, si sus células adquieren la habilidad de invadir el tejido circundante, se lo denomina maligno. Esta invasividad usualmente implica la capacidad para traspasar los límites del tumor original, migrar por el torrente sanguíneo o los vasos linfáticos y establecerse en otros

órganos formando tumores secundarios o metástasis. Cuanto más invasivo sea un cáncer, más dificultoso será erradicarlo.

Los cánceres se clasifican de acuerdo al tejido y al tipo celular del cual se originaron. Aquellos que derivan de células epiteliales, se denominan carcinomas y si provienen de tejido conectivo o células musculares, se clasifican como sarcomas. Existen otros tipos de cáncer como las leucemias y linfomas, que derivan de células hematopoyéticas y otros derivados de células nerviosas. Cada una de estas clasificaciones poseen varias subdivisiones de acuerdo al tipo celular específico, su localización sistémica, la estructura del tumor y grado de avance. Por ejemplo, un adenoma es un tumor benigno derivado de epitelio glandular mientras que su contraparte tumoral se denomina adenocarcinoma.

Uno de los problemas más importantes en el estudio del proceso tumoral no solo radica en que una célula tumoral funciona esencialmente en forma similar a una célula normal si no también por el hecho de que se han clasificado más de 200 tipos de cánceres y cada uno de ellos puede ser considerado como una enfermedad distinta con sus propios mecanismos de génesis y progresión.

### **5.1. Cáncer de mama**

El cáncer de mama es el tumor más frecuente en el sexo femenino. Es la causa más común de muerte entre las mujeres de 35-54 años; entre las de mayor edad ocupa el segundo lugar, después de las enfermedades cardiovasculares (Stein 1983). En Estados Unidos, aproximadamente una de cada diez mujeres desarrollará esta enfermedad y una de cada cuatro morirá como consecuencia de ella (Russo *et al.* 1987). Por medio de estudios epidemiológicos se sabe que el cáncer de mama resulta de una combinación de factores entre los que podemos mencionar a la regulación endócrina (Spicer *et al.* 1995), agentes externos como radiaciones ionizantes, dieta, estado socioeconómico (Russo *et al.* 1987) y factores genéticos o hereditarios (Chen *et al.* 1995). La complejidad de esta patología y la falta de conocimiento acerca de su etiología y biología dificultan el entendimiento y, por ende, la prevención y el tratamiento de dichas neoplasias.

## **5.2. Oncogenes: una retrospectiva de su descubrimiento**

Si bien el cáncer se conoce como enfermedad desde la antigua Grecia poco era lo que se sabía sobre su origen. No fue sino hasta fines del siglo XVIII que se obtuvieron las primeras evidencias de que agentes externos podrían ser causantes de la enfermedad. En 1775, el médico inglés Sir Percival Pott advirtió la alta incidencia de cáncer de escroto entre los desolladores londinenses a pesar de ser, en su mayoría, muy jóvenes y por ende atribuyó la causa del mal al hollín. Además de identificar una causa concreta del cáncer, la observación de Pott señalaba a un producto químico como el desencadenante de la enfermedad. Con el tiempo se reconocieron una gran cantidad de agentes químicos (anilinas en tumores de vejiga, asbestos y tabaco en cáncer de pulmón, etc.) (Doll 1992) o de origen físico, como la radiación, relacionados con la génesis del proceso tumorigénico. Como ejemplo de esta última categoría basta recordar la estrecha relación entre diversos tipos de cánceres con las detonaciones nucleares sobre Hiroshima y Nagasaki el 6 y 8 de agosto de 1945.

La capacidad de los agentes químicos y físicos de inducir cáncer se descubrió pues, por vía epidemiológica. Sin embargo, en el año 1911, Peyton Rous encontró que filtrados de sarcomas de pollo eran capaces de inducir esa enfermedad en células sanas, demostrando así la existencia de un virus infeccioso, al que se llamó posteriormente Virus del Sarcoma de Rous (RSV), siendo éste el primer agente biológico conocido causante de un determinado tipo de cáncer (Rous 1911). Con el tiempo se descubrieron y caracterizaron un gran número de virus oncogénicos, en su mayoría retrovirus.

Los viriones de los retrovirus contienen como material genético dos moléculas idénticas de ARN de 5-10 kb. Durante el curso de la infección, los genes virales son convertidos a ADN doble cadena por la transcriptasa reversa viral y como tal se integra covalentemente al cromosoma de la célula huésped.

Poseen esencialmente un promotor fuerte denominado LTR (del inglés Long Terminal Repeat) y tres genes:

- 1) *gag*, que codifica para las proteínas de la nucleocápside que envuelve al ARN.
- 2) *pol*, que genera un conjunto de enzimas con actividad de ADN polimerasa-ARN dependiente, endonucleasa e integrasa.
- 3) *env*, para las glicoproteínas de envoltura del virión.

En general, los retrovirus con tal genotipo son altamente infectivos pero poseen poca o nula capacidad transformante. ¿Qué características tiene el RSV para ser infectivo y altamente carcinogénico?. La respuesta llegó seis décadas después del descubrimiento de Rous. Utilizando diversas cepas mutantes del virus, G. Martin y P. Duesberg demostraron que la porción transformante del RSV se encontraba en un fragmento de 2 kb en la zona 3' del virus (Martin *et al.* 1972; Martin 1970). Este cuarto gen, clonado luego por D. Stehelin (Stehelin *et al.* 1976a) fue denominado *v-src* (contracción de la palabra sarcoma), siendo el único responsable de la actividad oncogénica del RSV, carece de función en la replicación viral. Quedó así demostrada la base genética del proceso tumoral, algo que ya se infería de la predisposición hereditaria para algunos cánceres y de las frecuentes anomalías cromosómicas halladas en células transformadas. Para esa época se habían clonado varios de los genes responsables de la actividad tumorigénica de otros retrovirus y se los englobó bajo el nombre de oncogenes retovirales (*v-onc*). A diferencia del RSV, que contiene sus tres genes y un oncogén extra, la mayoría de los retrovirus transformantes poseen uno o más oncogenes reemplazando parte de su genoma clásico, produciendo así proteínas de fusión (por lo general del tipo Gag-Onc) y por ende son virus defectivos que necesitan la ayuda de un virus "helper" para poder replicarse.

Poco tiempo después, gracias a los trabajos de J. Bishop y H. Varmus (Stehelin *et al.* 1976b) (quienes recibieron el Premio Nobel en 1989), se descubrió que el gen *src* se encontraba también presente en el genoma de células aviares no infectadas. Estudios subsecuentes determinaron que las secuencias relacionadas al *v-src* del RSV eran exones de un gran gen celular (denominado entonces *c-src*), el cual se encuentra conservado durante la evolución. De esta forma fueron aislados de organismos tan diversos como insectos, anfibios, peces, roedores y del hombre. Trabajos de T. Hunter, B. Sefton y R. Erickson mostraron que

la proteína Src poseía actividad de proteína kinasa y era capaz de fosforilar residuos de tirosina, una acción enzimática muy poco conocida en esa época. Por otra parte, el grupo de H. Hanafusa determinó las diferencias entre el gen viral y su contraparte celular normal demostrando que la presencia de mutaciones en la proteína viral le conferían una mayor actividad de tirosina kinasa (Marx 1994). Estos cambios cualitativos, sumados a la sobreexpresión que produce el eficiente promotor viral (LTR) proveen un poderoso estímulo proliferativo a las células infectadas con el RSV. Cabe aclarar aquí una ironía en la historia del *src*: a pesar de la gran influencia del descubrimiento y estudio de este gen sobre el desarrollo en el campo de los oncogenes y las nuevas bases genéticas del cáncer, no se ha demostrado hasta el presente que el *c-src* se encuentre positivamente involucrado en algún proceso tumorigénico humano.

Luego del hallazgo del *src*, se estudiaron otros *v-oncs* y nuevamente estos genes formaban parte de las células que ellos solían infectar. Surge entonces la teoría de la transducción retroviral por la cual los retrovirus oncogénicos adquirieron su *v-onc* del genoma celular en una infección ancestral por algún mecanismo de recombinación que todavía queda por aclarar (Bishop 1983).

Posteriormente se descubrieron nuevos oncogenes y actualmente se conocen varios genes comprendidos en tal clasificación aunque no se ha encontrado su contraparte retroviral. Estos oncogenes no retrovirales fueron puestos en evidencia estudiando tumores cuyos genes se encontraban amplificados o rearrreglados, observando los sitios de integración de ciertos provirus o por medio de métodos de transferencia génica o transfección, donde el ADN de células neoplásicas es capaz de originar focos de transformación en un sistema competente. Debido a la existencia de estos genes en el genoma humano surgió la inquietante pregunta: ¿Llevamos en nuestros genes la semilla de nuestra propia destrucción?. Los grandes avances realizados en este campo durante la década del '80 permiten inferir que la respuesta no es tan simple como parece.



### 5.3. Definición de oncogén

Un **oncogén** se define como un gen viral o celular capaz de inducir una o más características de transformación neoplásica cuando es introducido, ya sea solo o en combinación con otros genes, en una célula apropiada. Los genes celulares normales que pueden ser convertidos a oncogenes activos se denominan **proto-oncogenes**. El proceso por el cual un gen con función normal (proto-oncogén) da lugar a uno con capacidad de perpetuar la división celular o su transformación (oncogén), se denomina **activación**.

El extraordinario grado de conservación de la mayoría de los proto-oncogenes a través de la evolución de los metazoos y la implicancia de los alelos mutados de estos genes en diversas neoplasias evidentemente sugiere que los proto-oncogenes controlan pasos cruciales en el desarrollo y la proliferación celular. Tales controles resultan perturbados por las alteraciones que convierten a estos genes en oncogenes. En esencia, las proteínas codificadas por los proto-oncogenes se encuentran en diversos compartimentos celulares desarrollando una variedad de funciones en los mecanismos que convierten las señales extracelulares en controles transcripcionales dentro del núcleo (Varmus 1989).

### 5.4. Activación de los oncogenes

Los mecanismos de activación por los cuales un proto-oncogén puede convertirse en un oncogén con capacidad tumorigénica son:

a) **Transducción**: inserción de exones de un gen en el genoma de un retrovirus, usualmente con alteraciones internas de la secuencia codificante y bajo la acción de un promotor constitutivo fuerte, causando la eficiente producción de una proteína anormal. Ej.: *v-src*, *v-fos*, *v-ras* y todos los oncogenes retrovirales.

b) **Inserción mutacional**: producción aumentada de ARNm de un proto-oncogén debido a la presencia de un promotor o LTR de un provirus. En algunos casos esta inserción provoca una alteración en la secuencia codificante del gen. Ej.: *c-myc*, *int-1*, *int-2*, etc.

c) **Mutaciones puntuales**: alteración de la secuencia y de las propiedades bioquímicas de los productos proteicos. Ej.: familia de genes *ras* y el gen *ret* (única mutación oncogénica conocida capaz de ser heredada en forma autosómica dominante).

d) **Amplificación**: producción aumentada de ARNm y proteína debido al incremento en el dosaje génico. Ej.: *N-myc*, *L-myc*, *neu*, etc.

e) **Translocación cromosómica**: el cambio en el entorno regulador del gen provoca una expresión alterada (ej.: *c-myc*, *bcl-1* y 2, *tcl-1*, etc.). En algunos casos involucra la formación de proteínas quiméricas. Ej.: Abl/Bcr, Trk, Met, etc.

f) **Interacción proteica**: estabilización proteica, función bioquímica alterada o competencia con proteínas de función normal. Ej.: pp60c-src/AgT mediano, p53 mutada/p53 normal, v-ErbA/c-ErbA, etc.

### 5.5. Clasificación de los oncogenes

Según su funcionalidad y localización celular las proteínas codificadas por oncogenes pueden clasificarse en:

a) **extracelulares**: son análogos a factores de crecimiento, como Sis (cadena B del PDGF) e Int-2 (análogo al bFGF).

b) **de membrana**: los cuales se subdividen a su vez en:

i) **de transmembrana**: son análogos a receptores de factores de crecimiento. Poseen en general actividad de tirosina kinasa regulada por el ligando y muchos de ellos se autofosforilan. Ejemplos de este grupo son (en paréntesis figura el ligando conocido): c-ErbB-1 o rEGF (EGF), c-Fms (CSF o factor estimulador de colonias), c-ErbB-2 o HER2/Neu (heregulinas), familia del Trk (diversos factores de crecimiento neuronal), Met (factor de crecimiento de hepatocitos), etc.

También se han encontrado unos pocos oncogenes con estructura de siete regiones de transmembrana (similares a los que acoplan proteínas G para su acción) como el Mas.

ii) **de membrana interna**: dentro de esta clasificación se incluye a los grupos de proteínas con actividad de tirosina kinasa (c-Src, c-Fgr, c-Yes, etc.) y a un grupo de proteínas G (con actividad de GTPasa) como la familia del Ras. Se considera que ambos grupos están involucrados en la transducción de estímulos externos. La mayoría de estas

proteínas se encuentran ancladas a la membrana plasmática (orientadas hacia el citoplasma) por residuos acilos o isopreniodes como pp60<sup>Src</sup> y la p21<sup>Ras</sup> respectivamente.

c) **citoplasmáticos**: son proteínas solubles con actividad de serina/treonina kinasa, como el c-Mos y el c-Raf.

d) **nucleares**: poseen afinidad por sitios promotores específicos del ADN y son reguladores de la transcripción de genes que controlan la división celular. En general, su expresión es dependiente del ciclo celular y se activan frente a estímulos mitogénicos o diferenciadores. Ejemplos de este grupo son las proteínas codificadas por las familias de genes *myc*, *fos* y *jun*.

En la Fig. 1 se aprecia un esquema de dicha organización.

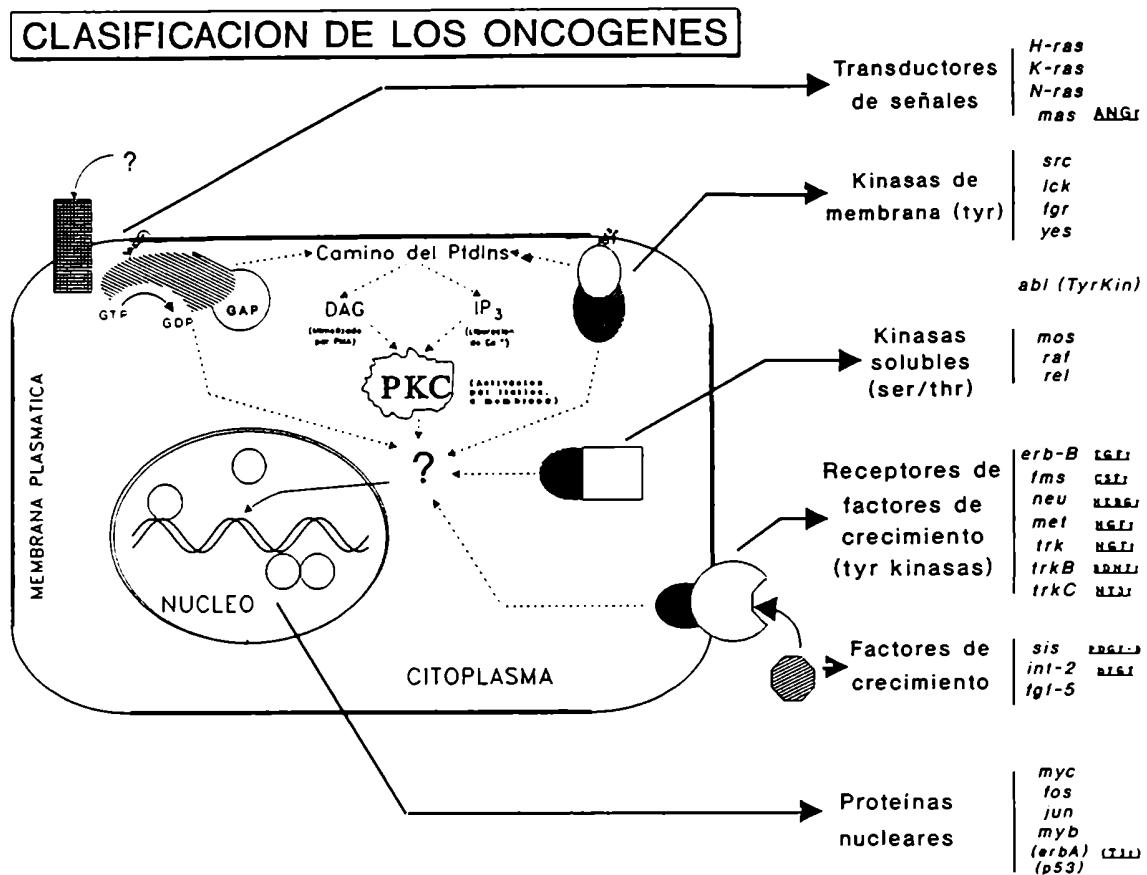


Fig. 1.- Clasificación de los Oncogenes

Esta clasificación no debe considerarse como estricta pues existen un gran número de oncogenes y de proteínas alteradas que funcionan como tales con diferentes localizaciones, por ej. c-Abl, proteína kinasa ubicada fundamentalmente en el núcleo aunque también se halla presente en la superficie interna de la membrana celular y en el citoplasma unido a filamentos de actina; o que sufren relocalización subcelular al ser estimuladas, por ej. c-Raf migra del citoplasma a la membrana para su activación y las proteínas MAPk son capaces de migrar al núcleo al ser activadas.

### **5.6. Proto-oncogenes que codifican para proteínas nucleares**

Los primeros trabajos con los antígenos tumorales de papovavirus indicaban que el núcleo celular era probablemente el escenario donde actuaban las proteínas involucradas en transformación celular. Debido a esto, resultó sorprendente cuando las primeras evidencias en el estudio de *v-oncs* mostraban un grupo de proteínas confinadas al citoplasma o a la membrana plasmática. Incluso experimentos realizados con células enucleadas sugerían que al menos las alteraciones morfológicas inducidas por el v-Src podían ocurrir aún en ausencia de núcleos (Beug *et al.* 1978). Así, muchos de los primeros investigadores en esta área descartaban la fracción nuclear para el estudio de oncogenes. Sin embargo, esta situación cambió posteriormente habiéndose aislado una gran variedad de proto-oncogenes con productos nucleares. Estos incluyen las familias de los genes *myc*, *fos*, *jun*, el *myb*, *ski*, *v-erbA*, *p53mut* y probablemente el *rel*, *ets*, *vav* y *abl*. Dado que las proteínas oncogénicas citoplasmáticas y de membrana que se descubrieron tenían una función en la transducción de señales mitogénicas, resultó lógico considerar a los oncogenes nucleares también como parte de este sistema de señales. Es así que las oncoproteínas nucleares pueden ser consideradas como mediadores de las etapas finales de la transducción de señales, convirtiendo la información del citoplasma al núcleo y una vez allí, tendrían una función directa en la regulación de la expresión génica, interactuando con elementos en el ADN que estimulen o repriman la expresión de genes específicos.

### 5.6.1. Familia de genes *myc*

En 1977 el oncogén *v-myc* fue identificado como el gen transformante presente en 4 cepas distintas del Virus de la Leucemia Aguda Aviar (ALV) y su homólogo celular se encuentra altamente conservado en distintas especies (Kato *et al.* 1992). Se han identificado otros genes con una gran homología al *c-myc*. El *N-myc*, amplificado en diversos neuroblastomas está asociada con un pronóstico desfavorable (Bordeur *et al.* 1984). El gen humano *L-myc*, sobre-expresado en cáncer de pulmón de células pequeñas. Posteriormente se agregaron otros miembros a esta familia, como el *B-myc* y el *S-myc*. Por estudios de transferencia génica se ha corroborado que el *c-myc* activado puede immortalizar fibroblastos de rata normales pero es necesaria la acción cooperativa de otro oncogén, como el *ras*, para desarrollar un fenotipo transformado (Land *et al.* 1983).

El gen *c-myc* puede ser activado por distintos mecanismos: inserción proviral, translocación cromosómica, amplificación génica o mutaciones que incrementen la transcripción o la vida media de su ARNm (Huber 1989). La expresión alterada del *c-myc* suele estar asociada con linfomas, especialmente del tipo B, aunque también se lo ha encontrado desregulado en diversos tumores. En los linfomas de Burkitt, un evento de translocación cromosómica une al *c-myc* con los elementos reguladores de la expresión de inmunoglobulinas (Ig). Eventos similares se han descrito en plasmocitomas murinos y en diversos tumores de células T (Kato *et al.* 1992). La amplificación génica del locus *c-myc* ha sido descrita en varias líneas celulares y en diversos tejidos de tumores primarios como cáncer de células pequeñas de pulmón (Little *et al.* 1983) y de mama (Escot *et al.* 1986).

Los componentes primordiales de la familia de genes *myc* poseen una estructura de 3 exones y se transcriben a partir de diversos sitios de iniciación regulados independientemente generando un cuadro complejo de expresión génica sometido a un estricto control. Asimismo, tanto el ARNm de *c-myc* como de su proteína poseen una vida media muy corta (del orden de 0.5-2hs) característica de muchas oncoproteínas nucleares. El ARNm de *c-myc* produce dos proteínas: Myc1(439 aa., 65Kdal) y Myc2 (453 aa, 68Kdal) que comienza en codón alternativo CUG 5' respecto del anterior (Ryan *et al.* 1996).

El *c-myc*, como la mayoría de los proto-oncogenes nucleares, pertenece a un grupo de mensajeros celulares comunmente denominados genes de competencia o de respuesta primaria inmediata dado que su expresión es activada por una variedad de estímulos mitogénicos, independientemente de la síntesis de nuevas proteínas, durante las primeras etapas de la transición  $G_0$ - $G_1$  (Kelly *et al.* 1983). Cuando diversos linajes celulares son estimulados a entrar a la fase  $G_1$  por tratamiento con diversos agentes, se observa un incremento transiente del ARN de *c-myc* dentro de las 1-3 hs para disminuir luego a un nivel basal constante a través de todo el ciclo celular (Cohen *et al.* 1989).

La proteína c-Myc posee una señal de localización nuclear, un dominio de transactivación y una zona de dimerización y unión específica al ADN en la porción carboxi terminal, compuesta por dominios clásicos de cierres de leucina (LZ), región básica (BR) y hélice-vuelta-hélice (HLH) (Marcu *et al.* 1992). Esta estructura BR-HLH-LZ le permite asociarse con una estructura similar de la proteína denominada Max (Blackwood *et al.* 1991). Myc *per se*, se une con poca afinidad a sitios específicos en el ADN, sin embargo, tanto los dímeros Myc/Max, Max/Max como los dímeros forzados Myc/Myc son capaces de reconocer una secuencia consenso específica CAC(G/A)TG (Blackwood *et al.* 1992). A diferencia de c-Myc, Max no posee ningún dominio de activación transcripcional, se expresa en niveles bajos y constantes independientemente del estadio de proliferación de la célula y su vida media supera las 24 hs (Kato *et al.* 1992).

En condiciones no proliferativas, los niveles bajos de c-Myc favorecen la formación de homodímeros de Max. Debido a la falta de un dominio de activación, Max/Max podría actuar como un represor al unirse al DNA. En respuesta a un estímulo mitogénico, la inducción de *c-myc* permitiría la formación de heterodímeros Myc/Max, con capacidad transactivante, los cuales permiten la expresión de genes necesarios para la proliferación como la ornitina decarboxilasa y la protimosina (Ryan *et al.* 1996). Consecuentemente, una disminución en los niveles de *c-myc* reestablecería el estado de inhibición del crecimiento (Torres *et al.* 1992).

### 5.6.2. Familia de genes *fos*

El proto-oncogén *c-fos* es el homólogo celular del oncogén identificado en dos retrovirus murinos: el virus de sarcoma murino de Finkel-Biskis-Reilly (FBR-MSV) y el de Finkel-Biskis-Jenkins (FBJ-MSV), los cuales poseen la habilidad de inducir sarcomas osteogénicos en ratones (Verma *et al.* 1986). La sobreexpresión de *c-fos* en ratones transgénicos produce anomalías hiperplásicas en los huesos largos y, a tiempos prolongados, sarcomas osteogénicos con ciertas similitudes a los sarcomas invasivos producidos por los FBR y FBJ-MSV (Goralczyk *et al.* 1990). Por medio del uso de anticuerpos que reconocen Fos, se han clonado diversas proteínas antigénicamente relacionadas como FosB, Fra-1 y Fra-2 (Cohen *et al.* 1989).

El gen *c-fos* está compuesto por 4 exones que generan un transcripto de 2.2 Kb con diversas secuencias que regulan su estabilidad y una proteína de 380 aa con una movilidad electroforética anómala en geles de SDS-PAGE de 55 Kdal, posiblemente debido al alto contenido de prolina y a la fosforilación (el 90% en serina). Dentro de la estructura de la familia de proteínas Fos se destacan la presencia de un LZ y una BR que le permite asociarse a otros péptidos con secuencias análogas. Dentro del promotor existen diversas zonas regulatorias de la expresión incluyendo secuencias para la transcripción basal, elementos que responden a la estimulación por suero (SRE), al PMA (TRE o AP-1) a AMPc (CRE), etc. (Cohen *et al.* 1989).

El ARNm maduro se expresa en niveles basales muy bajos en la mayoría de las células excepto en ciertos grupos celulares de tejidos embrionarios, médula ósea y algunas células hematopoyéticas. Se han observado incrementos transientes en la expresión de *c-fos* en diversos tipos celulares luego de la estimulación con agentes tales como suero, PDGF, EGF, FGF, CSF-1, Il-3, NGF, etc. y la consiguiente proliferación o diferenciación (Curran 1988a). La acumulación del ARNm alcanza su máximo a los 30-45 min para retornar a los niveles basales antes de las 2 hs siguientes a la estimulación como consecuencia de su vida media muy corta (Muller *et al.* 1988). Esta disminución ocurre aún ante la presencia continua de factores de crecimiento en el medio. La inducción, que puede incrementar 100 veces los niveles de ARNm, ocurre aunque la síntesis de proteínas se encuentre bloqueada. La proteína

c-Fos se sintetiza con una cinética consecuente a la aparición de su ARNm y posee una vida media de 2 hs aproximadamente.

Dado que células transformadas por *c-fos* no son competentes (Bravo *et al.* 1985) y que el bloqueo de c-Fos por medio de secuencias antisentido impide la proliferación celular (Holt *et al.* 1986), se considera que c-Fos se encuentra involucrado en procesos relacionados con la división celular y que su expresión es necesaria pero no suficiente para que la célula evolucione desde un estadio G<sub>0</sub> hacia G<sub>1</sub> ante un estímulo mitogénico.

### 5.6.3. Familia de genes *jun*

El oncogén *v-jun* fue originalmente descubierto como el gen transformante del virus del sarcoma aviar 17 (ASV 17), el cual induce fibrosarcomas en pollos y transformación oncogénica en cultivos de fibroblastos embrionarios de aves. ASV 17 contiene un único oncogén, denominado *jun* (contracción de "ju-nana", 17 en japonés) (Maki *et al.* 1987), que posee homología con una proteína activadora de la transcripción en levaduras denominada GCN4. Algunas pistas sobre la naturaleza de este factor de transcripción provinieron del dato que la secuencia palindrómica a la que se une GCN4 está relacionada con la secuencia TRE de reconocimiento de la proteína activadora-1 (AP-1), un factor de transcripción involucrado en la respuesta a ésteres de forbol (ver más adelante: **AP-1, la conexión Jun-Fos**). Una serie de análisis bioquímicos confirmó posteriormente que c-Jun era uno de los componentes principales de la actividad de AP-1.

La proteína c-Jun (39 Kdal) se encuentra codificada por un gen sin intrones a través de un ARNm de 2.4 Kb. Las regiones regulatorias del gen poseen un sitio TRE (TGACATCA) que juega un papel importante en el control de la expresión de *c-jun* (Vogt *et al.* 1989).

En el genoma de los vertebrados se encuentran al menos otros dos genes altamente relacionados denominados *junB* y *junD* (Cohen *et al.* 1989). Los tres miembros de la familia *jun* se activan rápidamente frente a un estímulo extracelular aunque cada uno responde a diferentes señales (ver más adelante).



#### 5.6.4. AP-1, la conexión Jun-Fos

El factor AP-1 fue descrito inicialmente como un extracto de células HeLa capaz de unirse al ADN que específicamente reconoce elementos activadores en el genoma de SV40 y en el gen de la metalotioneína II humana. Los sitios de unión de AP-1, denominados TRE (elemento de respuesta a TPA) se encuentran además en las regiones de control de diversos genes celulares y virales que son estimulados por los ésteres de forbol (Angel *et al.* 1991). AP-1 está constituido principalmente por los productos proteicos de diversos genes de las familias *fos* y *jun*. Este grupo se caracteriza principalmente por la capacidad de formar dímeros gracias a las regiones BR-LZ, unirse a promotores de genes que contengan la secuencia consenso TRE y regular positiva o negativamente la expresión dichos genes. Además, ciertos miembros de estas familias, especialmente el c-Jun, son capaces de dimerizarse con proteínas denominadas CREB/ATF que se caracterizan por unirse a la secuencia consenso de respuesta al AMPc (CRE) luego de la inducción por este agente (Curran *et al.* 1988b).

Como todos los miembros de la familia de proteínas con BR-LZ, los componentes de AP-1 deben dimerizarse para unirse al ADN. Las proteínas Jun unen ADN como homodímeros o heterodímeros Jun/Fos mientras que las proteínas Fos no forman homodímeros estables. Debido a su gran estabilidad, los dímeros Jun/Fos exhiben una mayor actividad de unión al ADN y habilidad transactivadora que los dímeros Jun/Jun. Jun es el activador transcripcional más potente dentro de las proteínas AP-1, tanto como homodímero o en combinación con c-Fos. Las proteínas Fos también varían en su capacidad de activar la transcripción en combinación con Jun siendo c-Fos y FosB más potentes que Fra-1 o Fra-2. La combinatoria de interacciones entre las proteínas Jun y Fos dan lugar a dímeros con distintas actividades a pesar que su especificidad por TRE es similar. Todos estos dímeros contribuyen a la actividad de AP-1, el cual puede ser considerado como un mensajero nuclear que media la acción de vías de transducción de señales estimuladas por factores de crecimiento, hormonas, citokinas o neurotransmisores. La actividad de AP-1 también se encuentra aumentada en células transformadas por diversos oncogenes como v-Src, H-Ras, o v-Raf (Karin *et al.* 1992).

Los mecanismos de transducción de señales afectan la actividad de AP-1 en dos niveles:

a) **transcripcional**: los genes AP-1 se inducen ante diversos estímulos extracelulares. La expresión más rápida y transiente la exhibe *c-fos*, especialmente a través de su elemento SRE, mientras que para genes como *fra-1*, la inducción es más larga y duradera. Fos se combina con proteínas Jun preexistentes formando dímeros estables y aumentando la actividad de AP-1. Al mismo tiempo la expresión de *c-jun* también es inducida por los mecanismos que activan a AP-1 siendo esta expresión más duradera que la de *c-fos*, posiblemente debido a la habilidad de c-Jun de autorregular su expresión a través del TRE de su promotor. La expresión de *junB* se estimula por agentes externos pero puede responder a distintas señales que *c-jun*; por ej., en células 3T3, *c-jun* es inducido por PMA y parcialmente inhibido por AMPc, mientras que *junB* y *c-fos* se estimulan por AMPc. En la mayoría de las células, la expresión de *junD* es constitutiva, aunque en células HeLa puede ser inducida por la activación simultánea de PKC y PKA. La diferente respuesta y cinética de inducción de los diversos genes *fos* y *jun* resulta en la formación de distintos complejos AP-1 a diferentes tiempos luego de la estimulación celular. El rol exacto de estos cambios dinámicos aún no se comprende completamente, aunque se sabe que algunos de ellos están involucrados en la activación de diversos genes (incluidos *c-fos* y *c-jun*) y en otros casos intervienen en la terminación de la respuesta, como se ha visto para JunB, el cual es capaz de reprimir *in vitro* la activación de *c-jun* (Karin *et al.* 1992).

b) **postraduccional** (regulación por kinasas y fosfatasas): A pesar de que todos los componentes de AP-1 son fosfoproteínas, el rol de la fosforilación en el control de la actividad solo ha sido estudiado extensivamente para c-Jun. Esta proteína posee al menos cinco sitios fosforilables, dos en su dominio de activación amino terminal (Ser63 y Ser73) y tres cercanos al dominio de unión al ADN en la zona carboxi terminal (Tre231, Ser243 y Ser246).

La fosforilación del dominio de activación, posiblemente mediada por JNK (Jun NH<sub>2</sub> terminal kinasa), incrementa unas diez veces su capacidad para estimular la transcripción. Estos sitios son fosforilados en respuesta a factores de crecimiento o por la expresión de oncogenes activados como Src, Raf y Ras provocando un cambio conformacional en la

molécula (Cohen *et al.* 1989). La zona carboxi terminal puede ser fosforilada *in vitro* por la caseína kinasa II (CKII) (una enzima constitutiva) en Tre231 y Ser249 inhibiendo en forma reversible la unión al ADN (Lin *et al.* 1992). Además, la estimulación celular con PMA o la expresión de H-Ras activado, inducen una rápida defosforilación de estos sitios con el consiguiente aumento en la afinidad por el ADN. Ello sugiere que estos estímulos no solamente activan la proteína c-Jun a través de la fosforilación del dominio de activación sino que además son capaces de inducir fosfatasas específicas que defosforilan a c-Jun, aumentando su afinidad por los TRE.

Estos resultados sugieren un escenario en el cual las proteínas Jun y Fos interactúan para unirse a secuencias consenso de unión de AP-1 en el ADN regulando así la expresión de diversos genes de inducción secundaria (indispensables para la progresión del ciclo celular) y su propia actividad. Estos fenómenos son inducidos por diversos agentes, esencialmente mitógenos, dando lugar a una constelación de proteínas interactuantes que proveen una regulación fina de diversos genes, permitiendo una respuesta celular variada y flexible a las señales del entorno. Es fácil imaginar entonces como la desregulación de estas proteínas puede afectar los sistemas de control de la proliferación celular. De esta forma, una célula refractaria a las señales normales para la diferenciación o el bloqueo del crecimiento bien podría transitar por el camino hacia la neoplasia.

### **5.7. Familia de proteínas Ras**

Las proteínas Ras juegan un papel importante en la transmisión de señales desde los receptores tirosina kinasa al núcleo para estimular la proliferación celular y la diferenciación.

Los genes *H-*, *K-* y *N-ras* codifican proteínas de 21.000 de peso molecular (denominadas genéricamente p21) con la capacidad de unir nucleótidos de guanina. Se localizan en la zona interna de la membrana citoplasmática ancladas por un residuo farnesilo localizado en la cisteína COOH terminal (Grand *et al.* 1991). Forman parte de la gran superfamilia de pequeñas proteínas G como las familias Rab, Arf, Sar, Ran, Rap y Rho (Rho,

Rac y Cdc42), involucradas en mecanismos tan diversos como la transducción de señales, organización del citoesqueleto y tráfico vesicular.

Los miembros más estudiados (H- y K-Ras) fueron originalmente identificados como los oncogenes de potentes retrovirus tumorigénicos: virus del sarcoma murino de Harvey (*v-H-ras*) y de Kirstein (*v-K-ras*). Asimismo, los genes *ras* celulares fueron paralelamente identificados como oncogenes dominantes en humanos mediante ensayos de transferencia génica y en modelos animales de tumores inducidos por carcinógenos. Los genes *ras* han sido identificados en mamíferos, aves, insectos, moluscos, plantas, hongos y levaduras y el alto grado de conservación de su secuencia sugiere un rol fundamental en la proliferación celular.

En mamíferos, p21 está compuesta generalmente por 189aa. Los 85 primeros aa son idénticos para los diversos organismos vertebrados estudiados y los 80 aa siguientes conservan un alto grado de homología (85% para cualquier par humano). El resto de la proteína es altamente variable excepto por los 4 últimos aa que contienen el motivo CAAX (A:aa alifático, X: cualquier aa) que actúa como señal de farnesilación (en C186), clivaje de AAX y metilación de la cisteína terminal (Barbacid 1987).

La activación de receptores de superficie convierten a las proteínas Ras de su estado inactivo (unidas a GDP) a su estado activo (unidas a GTP) promoviendo así una cascada de señales mitogénicas (ver **Vía de las MAPk**). Si bien p21 posee una capacidad GTPásica leve, ésta puede ser estimulada más de 100 veces por la acción de Proteínas Activadoras de la acción GTPásica (GAPs), las cuales regulan negativamente a p21, permitiendo su retorno al estado inactivo.

Los genes *ras* adquieren propiedades transformantes por mutaciones puntuales que ofrecen una resistencia a la hidrólisis del GTP favoreciendo que Ras se encuentre siempre activa, promoviendo un estímulo constante. Las mutaciones más frecuentes halladas en tumores (naturales o inducidos) se localizan en los codones 12, 13, 59 y 61 aunque estudios por mutagénesis *in vitro* han demostrado que alteraciones en los codones 63, 116 o 119 también le confieren propiedades transformantes (Lemoine 1990). En la actualidad se

considera que el gen *ras* es el oncogén más comunmente activado, contribuyendo al desarrollo de alrededor del 30% de los cánceres humanos, incluyendo los adenocarcinomas más comunes como colon (50%), pulmón (30 %) y páncreas (95 %) (Bos 1989). También se lo ha encontrado sobreexpresado en diversas patologías como cáncer de mama, colon, vejiga y próstata (Barbacid 1987).

### **5.8. Familia del receptor de EGF**

El EGF media sus efectos sobre la proliferación celular a través de su interacción con una glicoproteína de transmembrana de 170 KDal, el receptor de EGF (rEGF), codificada por el gen *c-erbB-1*, denominado así por su homología con el oncogén viral *v-erbB* del virus de la eritroblastosis aviar. La unión del EGF o del  $TGF\alpha$  produce la dimerización del receptor induciendo la actividad de tirosina kinasa intrínseca de esta molécula con la consiguiente activación de una cascada de señales específicas (ver **Vía de las MAPk**). Además de la autofosforilación del rEGF por unión del ligando específico (principalmente Tir-1068, -1148, -1173), se conocen varios sustratos posibles de esta kinasa: la fosfolipasa  $C\gamma$ , Ras-GAP, Grb2 y Shc. A su vez existen diversos aa en el rEGF fosforilables por otras kinasas que son capaces de regular positiva o negativamente la acción de esta molécula (Carpenter *et al.* 1991).

Se han descripto otros miembros de la familia del receptor de EGF entre los que se incluyen el ErbB-2 (también conocido como HER2/Neu), ErbB-3 (HER3) y el ErbB-4 (HER4) para los cuales se han descripto diversos ligandos putativos denominados genéricamente como heregulinas.

Estructuralmente estos receptores poseen: i) una región extracelular (con la capacidad de unir al ligando) glicosidada y con zonas ricas en cisteínas, ii) una porción hidrofóbica (de transmembrana) y iii) una porción intracitoplasmática con el dominio de tirosina kinasa y diversos sitios fosforilables de suma importancia en la regulación de este receptor.

Existe una gran homología entre las regiones citoplasmáticas del rEGF y del ErbB-2, mientras que los miembros más nuevos de esta familia (ErbB-3 y 4) se encuentran más relacionados entre sí que con el rEGF o el ErbB-2.

Si bien las funciones principales del rEGF han sido descritas a través de la homodimerización de este receptor, también se ha observado que es capaz de formar heterodímeros con el ErbB-2 y el ErbB-3 mientras que el proto-oncogén ErbB-2 es capaz de dimerizar con todos los miembros conocidos de esta familia.

La sobreexpresión de c-ErbB-2 (y en menor medida la del rEGF) se haya en más del 30% de los carcinomas de mama y posee un valor pronóstico para dicha enfermedad (Berns *et al.* 1992a; Chrysogelos *et al.* 1994) y otras como cáncer de ovario (Slamon *et al.* 1989). Su sobreexpresión en tumores respecto de tejido normal y su presencia en la membrana celular ha permitido postular a dichos receptores como posible blanco de tratamiento de dichas neoplasias a través de tirfostinas (inhibidores de tirosina kinasas) altamente específicas o de anticuerpos monoclonales conjugados con agentes citotóxicos.

### 5.9. Proteínas kinasas Activadas por Mitógenos (MAPk)

Las MAPk fueron originalmente descritas como Ser/Tre kinasas activadas por diversos factores de crecimiento, citoquinas y promotores tumorales en cultivos celulares de mamíferos. Poseen la característica particular de ser activadas solo cuando se fosforilan conjuntamente residuos Tre y Tir específicos. Estos residuos se encuentran separados por un solo aa en el subdominio VIII de kinasa precediendo la secuencia aminoacídica altamente conservada APE.

Esta característica de fosforilación dual amplió el espectro de las MAPk las cuales se dividen en 3 grupos:

a) **ERK (Extracellular signal-regulated kinase)**: constituye el grupo original de las MAPk y los miembros más representativos son ERK-1 (p44) y ERK-2 (p42). Ambas son activadas por fosforilación dual en la secuencia TEY (Tre183-Glu-Tir185) por acción de proteínas denominadas MAPkk o MEK (MAPk-ERK kinasas) de las cuales se conocen

MEK1 y MEK2. Las ERKs se encuentran en el citoplasma migran al núcleo luego de ser activadas (Pelech *et al.* 1992).

Se ha comprobado que las ERKs son capaces de fosforilar *in vitro* a un gran número de proteínas involucradas en la regulación de señales y de la división celular. Esta amplia variedad de sustratos y su ubicación en diversos compartimentos subcelulares la convierten en una pieza clave en el transporte de señales mitogénicas desde el citoplasma al núcleo.

Dentro de los sustratos más estudiados podemos mencionar a: i) Elk-1, una proteína que forma parte del Factor Complejo Ternario (TCF) con capacidad de unirse a la secuencia consenso SRE con la consiguiente activación de genes con dichas secuencias en su promotor, como por ej. el gen *c-fos* y ii) fosfolipasa A2 (PLA2), que al ser fosforilada en Ser505 por ERK aumenta su actividad induciendo así mecanismos de señales accesorios. Otras proteínas que sirven de sustrato *in vitro* para las ERKs son: S6 kinasa (p90rsk 1 y 2), MAPKAP-2, c-Myc, c-Fos, c-Jun y p53. Por último, ERK es capaz de autofosforilarse y de fosforilar a diversas kinasas la preceden en la secuencia de señales mitogénicas (ver **Vía de las MAPk**) como MEK, c-Raf y rEGF, posiblemente permitiendo una retroregulación negativa del sistema (Davis 1993).

b) **JNK (c-Jun NH2-terminal Kinase)**: fueron descubiertas por su capacidad de fosforilar a c-Jun en las Ser 63 y 73 (dominio transactivador) por inducción con luz UV (Davis 1994). Esta fosforiación permite la unión de un co-activador CBP el cual interactúa con TFIIB, componente de la maquinaria de transcripción con el consiguiente aumento en la expresión de genes con sitios AP-1 (TRE) en su promotor. Recientemente se observó que esta enzima también fosforila a Elf y a ATF2. Se conocen al menos dos formas: JNK1 y JNK2 de 46 y 55 Kdal respectivamente. Son fosforiladas por JNKK o por MEK4 en la secuencia TPY (Tyr183-Pro-Tyr185) bajo diversos estímulos: luz UV, TNF, IL-1, estrés (razón por la cual también se la conoce como SAPK (Stress Activated Prot. Kin.)) e inhibidores de la traducción como la anisomisina. Algunos de estos efectos son mediados a través de pequeñas proteínas G como Rac y Cdc42 (miembros de la familia Rho) y, en mucho menor grado, por la activación de Ras (Coso *et al.* 1995).

c) **p38 MAPk**: es la menos estudiada de las MAPk y puede ser fosforilada en la secuencia TGY (Tyr-Gly-Tyr) por la unión de lipopolisacáridos bacterianos al receptor CD14,

medio hiperosmolar, "heat shock" o IL-1. Es muy semejante a la proteína de levadura HOG1, involucrada en la respuesta a estrés osmótico (Davis 1994).

Estas kinasas se encuentran altamente conservadas en los organismos eucariotas desde levaduras a mamíferos como así también las diversas vías de transducción de señales en las que participan.

#### **5.10. Vía de las MAPk**

Con el descubrimiento y posterior estudio de diversas proteínas involucradas en la transducción de señales mitogénicas, muchas de ellas reconocidas como proto-oncogenes, se observó que ante un estímulo mitogénico determinado, se producía una activación en la función bioquímica de varias de estas proteínas. Esto indica que podrían estar involucradas en una "cascada de señales" hacia el núcleo para indicarle a la célula que debe iniciar los mecanismos para su duplicación. Con el uso de técnicas de transfección de cDNA, mediante la ayuda de proteínas mutantes (constitutivamente activadas o dominantes negativas) y gracias a los resultados de genética molecular obtenidos en levaduras, se ha logrado identificar a todos los componentes de algunas de estas vías, comunmente denominadas "vía de la MAPk", desde la unión del mitógeno a su receptor hasta el núcleo (Cano *et al.* 1995).

En síntesis, se puede describir la acción del EGF de la siguiente forma (ver Fig. 2):

a) la unión del EGF a su receptor produce la dimerización del mismo con la consiguiente autofosforilación (intracatenaria) en residuos tirosina. Otros receptores pueden ejercer su acción sobre proteínas intermediarias como Shc e IRS-1.

b) dicha fosforilación sirve de señal para reclutar en la membrana a una proteína adaptadora (Grb2) por medio de una zona denominada SH2 que reconocen motivos consenso específicos conteniendo fosfotirosina. Grb2 se encuentra normalmente asociada, por medio de secuencias SH3, a regiones ricas en prolina de la proteína Sos, la cual promueve el intercambio de GDP por GTP en p21 Ras. Asimismo, diversas proteínas GAPs (Ras-GAP, NF1, etc.) también poseen secuencias SH2 por lo cual son reclutadas a la



membrana para regular la inactivación del Ras-GTP una vez que éste haya propagado la señal.

c) El Ras-GTP (y no el Ras-GDP) convoca hacia la membrana a c-Raf, producto de un proto-oncogén, normalmente localizada en el citoplasma. Una vez en la membrana, c-Raf se asocia a ésta por medio de proteínas no completamente identificadas estimulando su actividad de Ser/Tre kinasa.

d) dentro de los sustratos de c-Raf se encuentran las MEKs, las cuales se activan y fosforilan a las kinasas ERKs.

e) La fosforilación dual de la secuencia TEY en ERK permite la activación de esta kinasa, su traslocación al núcleo y la consiguiente fosforilación de una pléyade de proteínas reguladoras de la transcripción.

f) Uno de los sustratos putativos de ERK es p62<sup>TCF/Elk-1</sup> y como fuera descrito anteriormente, la fosforilación de Elk-1 promueve la expresión de genes regulados por SRE, como el *c-fos* con el consiguiente efecto en la iniciación de la división celular (Ver **AP-1: la conexión entre Fos y Jun**).

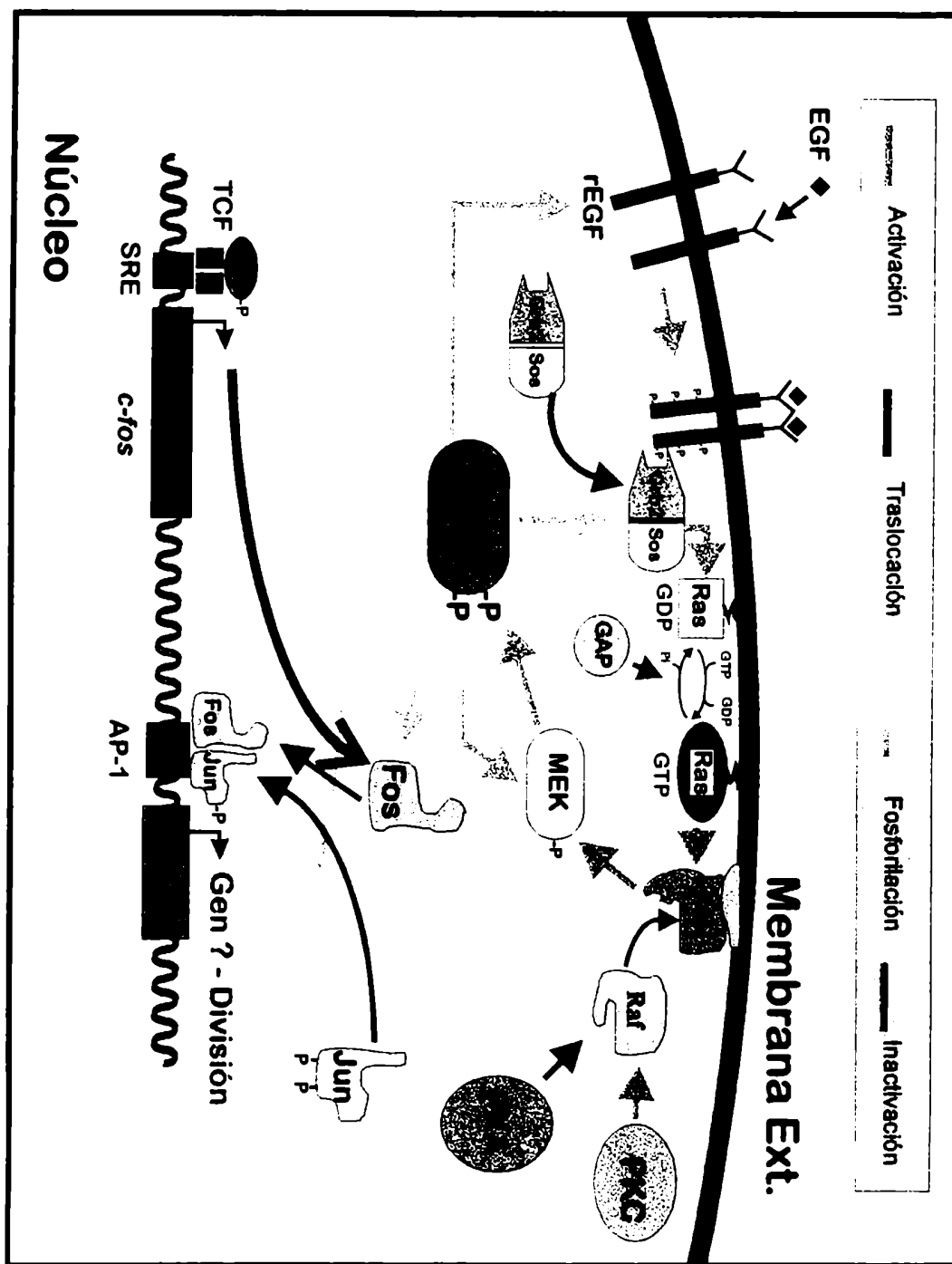


Fig. 2. Vía de las MAP kinasas.

Junto a esta vía activadora de kinasas existe un variado sistema de fosfatasa que regulan negativamente estas proteínas evitando que la señal mitogénica se propague temporalmente más allá de lo necesario (Burgering *et al.* 1995).

Es necesario destacar en este punto, que los mecanismos de señales en células eucariotas no funcionan necesariamente como carriles independientes. Así, existen vías paralelas de MAPk que reaccionan ante otros estímulos y que activan distintos sustratos (ej.: vía de la JNK) y otros sistemas de transducción de señales que pueden interrelacionarse con estas vías regulándola negativamente (ej: fosforilación de c-Raf por PKA en células que inhiben su crecimiento por inducción del cAMP) o positivamente (ej: acción de la PKC). Alternativamente, existen diversos sistemas, aparte de las tirosina kinasas de transmembrana y las tirosina kinasas acopladas a receptores (ej: c-src), que pueden activar estas vías. Algunos receptores acoplados a proteínas G provocan la hidrólisis de fosfoinosítidos con la consiguiente activación de diversas PKCs las cuales pueden activar a c-Raf o a p21Ras o, en otros casos, permiten la disociación de la proteína G en sus subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ , pudiendo esta última activar directamente a Ras. Por último, cabe recordar que diversas proteínas pueden cumplir la misma función en distintos sistemas celulares (ej: MEK puede ser activada por c-Raf, c-Mos y MEKK) y que algunas kinasas pueden fosforilar a sustratos que la anteceden en la secuencia de activación (ej: ERK es capaz de fosforilar a MEK, c-Raf y a rEGF).

En el futuro, el conocimiento de todas las vías de señales de transducción, su regulación y la interacción con otros sistemas permitirá desenmarañar los complejos mecanismos que gobiernan la duplicación celular contribuyendo al diseño de novedosos sistemas terapéuticos contra numerosas patologías, incluyendo el cáncer.

## 6. MODELO DE TRABAJO

Para la presente Tesis se utilizaron como modelo de estudio diversas líneas celulares de mama humana, en especial las líneas MCF-10A y MCF-10T.

**MCF-10A:** es una línea celular inmortalizada espontáneamente que mantiene las características geno y fenotípicas de tejido humano normal (Soule *et al.* 1990). Deriva de un cultivo primario obtenido de una mastectomía s.c. de una mujer de 36 años premenopáusica con extensiva enfermedad fibrocística. Posee características de células ductales lumbinales y su cariotipo es cuasidiploide con leves alteraciones cromosómicas (48,XX,3p-,6p+,+8,9+,+16). Esta línea carece de receptores para estrógenos y progestágenos y no es capaz de crecer en medio semisólido ni en ratones atímicos. No contiene secuencias génicas virales de SV40 (a diferencia de la línea no tumorigénica HBL-100) ni posee amplificación, rearreglo o activación mutacional de proto-oncogenes en el cromosoma 17 (*c-erbB-2* y *c-erbA-1*) o cromosoma 11 (*int-1* y *H-ras*). En particular, no se encontraron mutaciones en los codones 12, 13, 59, 61 y 63 del gen *H-ras*. A pesar que la activación de genes *ras* es poco frecuente en cáncer mamario humano, este oncogén es de particular interés pues: a) puede bloquear la senectud en keratinocitos e iniciar neoplasias epidérmicas, b) el v-H-ras es un potente iniciador de neoplasias mamarias en ratones transgénicos, c) el H-ras se activa en la mayoría de tumores mamarios inducidos por nitrosometilurea en ratas y se encuentra sobreexpresado en un gran número de patologías mamarias (Barbacid 1990).

**MCF-10T:** es una línea celular derivada de la MCF-10A obtenida de un grupo de colonias resistentes a geneticina (G-418) luego de transfectar dichas células con un oncogén T24 *H-ras* activado por mutación GGC=>GTC (Gly=>Val) en el codón 12 (Basolo *et al.* 1991). Esto indujo ciertas características de fenotipo transformado en estas células como crecimiento independiente de anclaje, proliferación en ratones atímicos, mayor motilidad celular (quimiotaxis y quimiocinesis), producción incrementada de colagenasa tipo IV y disminución de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Tipo I (Maloney Paine *et al.* 1992). Originalmente poseían una estructura cuboidal estratificada (a diferencia de las MCF-10A, descrita como planas escamoides) con formación de colonias altamente

pleomórficas, sin polaridad y con micrivellosidades grandes. Con los sucesivos pasajes, varias de estas características se fueron perdiendo, posiblemente debido al origen policlonal de esta línea (Russo *et al.* 1991).

**Otras líneas celulares:** Alternativamente, y como modelos comparativos con los modelos celulares MCF-10, se utilizaron las siguientes líneas de mama humana, ampliamente descritas en la literatura:

HBL-100, no tumorigénica, proveniente de leche de una mujer aparentemente normal, posee secuencias genómicas de SV40 (Caron de Fromentel *et al.* 1985).

Líneas derivadas de tejido neoplásico mamario: MDA-453, SKBR3 y MCF-7 (Soule *et al.* 1980).

## **7. MATERIALES Y METODOS**

### **7.1. Materiales utilizados**

Salvo que se especifique lo contrario, las sales y los solventes utilizados fueron de grado ACS o "biología molecular" de Sigma Chemical. Co (USA) o Merck (Alemania). Los medios de cultivo (RPMI, DME/F12) y los aditivos de cultivo (EGF, hidrocortisona, G418, etc) fueron comprados a Sigma Chemical. Co (USA), el suero equino y el suero fetal bovino son de BRL-Life Technologies (USA), la insulina fue donada por Laboratorios Beta (Argentina) y la gentamina (gentamicina, sulfato) es de Schering-Plough. Los diversos agentes utilizados para los tratamientos de las células (PMA, 4 $\alpha$ OH forbol, DiBuAMPc, etc.) provienen de Sigma Chemical. Co (USA). Las drogas para electroforesis en PAGE o agarosa, así como las membranas de transferencia son de BioRad Lab. (USA) o BRL-Life Technologies (USA), grado UltraPure.

El IGF-I (N-Met<sup>-</sup>) recombinante humano (Bachem, USA) y el TGF $\beta$ 1 recombinante (R&D Systems, USA) fueron cedidos por el Dr. Lino Baraño y sus colaboradores.

### **7.2. Cultivo de líneas celulares**

La línea celular MCF-10A fue cultivada en medio DMEM/F12 suplementado con 5 % de suero equino, 0.5 ug/ml de hidrocortisona, 5 ug/ml de insulina, 0.01 ug/ml de factor de crecimiento epidérmico, 0.1 ug/ml de toxina colérica y 50 ug/ml de gentamicina en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> en aire humidificado a 37°C.

MCF-10T fue cultivada en el mismo medio de las MCF-10A con el agregado de 100 ug/ml del antibiótico de selección genética (G-418).

La línea MCF-10A (pasaje 168) y sus variantes transfectadas fueron cedidas por el Dr. Silvio Gutkind (LCDO, NIDR-NIH, Bethesda, USA) y por el Dr José Russo (Fox Chase Cancer Center, Filadelfia, USA). En general, para los trabajos realizados en esta Tesis, se

utilizó la línea MCF-10A entre los pasajes 170 y 185, tripsinizándose cada 3-4 días y luego de unos 5-8 repiques se procedía a descongelar nuevas células.

Debido a su cuasi-normalidad, esta línea celular exhibe una gran adherencia a la placa de cultivo y entre ellas mismas cuando alcanzaban confluencia. Dado que los protocolos tradicionales de tripsinización solían cromatinizar las células o permitían la formación de cúmulos celulares difíciles de separar, se procedió a optimizar el protocolo para repicar las líneas MCF-10A y MCF-10T. Luego de retirar el medio de cultivo y realizar dos lavados con PBS, las células fueron incubadas con 0.5 ml por frasco de cultivo (75 cm<sup>2</sup>) de tripsina 0.01% en PBS-EDTA 1mM durante 10 min para desestabilizar las uniones célula-célula (al microscopio se observa un leve redondeamiento y separación de las mismas), posteriormente se agregaron 0.2 ml de tripsina 0.05% en PBS-EDTA 1mM durante 10 min hasta observar que las células comenzaban a separarse. Luego de golpear enérgicamente el frasco, se neutralizó la tripsina por agregado de 5-8 ml de medio HS (DME/F12 con 5% suero equino y antibiótico) lavando 2-3 veces la base interior del frasco y transfiriendo el medio con las células a un tubo estéril de 15 ml para su conteo y posterior centrifugación a 1000 rpm por 5 min en una centrífuga clínica. El precipitado celular fue resuspendido en medio HS y plaqueado en las densidades celulares y los medios adecuados para cada tratamiento. En el caso del mantenimiento de la línea, se plaqueaba a una densidad celular de 5000-10000 cél/cm<sup>2</sup> en medio completo.

Para la criopreservación, se tomaron alícuotas de las células recién tripsinizadas en criotubos a 0°C (por lo general 1-1.5 ml conteniendo 0.5-1.5x10<sup>6</sup> células/ml), se adicionó DMSO (dimetilsulfóxido) hasta 7% y suero equino o fetal bovino hasta 10-20%. Se enfriaron lentamente, primero 2-5 hs a -20°C y luego 16-24 hs a -70°C antes de almacenarlas en nitrógeno líquido. Para obtener nuevos repiques a partir de células congeladas, el criotubo se calentó rápidamente a 37°C hasta la descongelación del medio y se transfirió el contenido a un tubo de cultivo estéril de 15 ml conteniendo 5 ml de medio HS. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante, el precipitado celular se resuspendió en el volumen adecuado de medio completo y se plaquearon en un frasco de cultivo estéril.

El resto de las líneas celulares de mama humana utilizadas: MCF-7, MDA 453, SKBR3, y HBL-100, fueron mantenidas en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % suero fetal bovino y 50 ug/ml de gentamicina. La tripsinización fue llevada a cabo mediante protocolos tradicionales. Todas ellas fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC). Los protocolos de cultivos son modificaciones de los procedimientos descriptos en (Doyle *et al.* 1994)

### **7.3. Análisis de la proliferación celular**

El efecto de distintos agentes en estudio sobre la proliferación celular fue analizado comparando el contenido total de ADN de las células tratadas y no tratadas luego de un cierto tiempo de exposición con los compuestos.

El contenido de ADN celular fue estimado por la fluorescencia emitida por el complejo ADN-Hoescht 33258 en un fluorómetro o en un minifluorómetro TKO 100 (Hoefer Scientific Instruments) según el método de Labarca y Paigen modificado por el fabricante. En la presencia de ADN el Hoechst 33258 (bis-benzimidazol) posee una longitud de onda de excitación de 365nm y emisión de 458nm (sin ADN los máximos de excitación y emisión del Hoechst 33258 son 356nm y 492nm respectivamente). Este incremento en la fluorescencia es altamente específico para el ADN uniéndose preferentemente a zonas ricas en A-T, tanto doble como simple cadena y prácticamente no es interferido por el ARN o las proteínas (Labarca *et al.* 1980). El fluorómetro TKO 100 posee una lámpara de mercurio con un espectro de excitación cuyo máximo es 365nm (ancho de banda: 100nm) y un fotodetector cuyo filtro lee la luz emitida a 460nm (ancho de banda: 10nm). Cuando se usó un fluorómetro convencional se fijó la longitud de onda de excitación en 365 nm y la de emisión en 458 nm. En todos los casos las mediciones se realizaron por triplicado y los valores se expresan relacionados al valor de siembra (día 0 de tratamiento). Las barras representan la desviación estándar de los análisis.



Las células MCF-10A y MCF-10T fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 20.000 células por pocillo ( $10.000 \text{ células/cm}^2$ ) en medio DME/F12 conteniendo 5% de HS y 50  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina (medio HS) durante 16-20 hs. Posteriormente, el medio fue reemplazado por medio de cultivo adecuado con el agregado de los agentes a analizar. Los medios utilizados para estos análisis fueron: medio BSA, medio completo o MLS (Medio Libre de Suero y proteínas optimizado para hibridomas, Cat. Sigma S2772). La placa fue mantenida a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  durante 72-96 hs con un cambio de medio cada 48 hs. Al cabo de 3-4 días, el medio fue removido, las células fueron lisadas con 50  $\mu\text{l}$  de cloruro de guanidinio 6M y congeladas a  $-20^\circ\text{C}$  para su posterior análisis. Para estimar el contenido de ADN, se agregó a cada pocillo 250  $\mu\text{l}$  de solución TEN (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA y 100 mM NaCl), las células fueron sonicadas durante 5 seg y luego de adicionar 1.8 ml del colorante (0.1  $\mu\text{g/ml}$  de Hoescht 33258 en solución TEN) e inubar 5-10 min en oscuridad, la fluorescencia fue cuantificada en el fluorómetro previamente calibrado con una solución de ADN de esperma de salmón sonicada de concentración conocida.

Cuando se utilizaron otras líneas celulares éstas fueron plaqueadas en RPMI 1640 con 1-2% de FCS y se procedió de forma análoga a las MCF-10A. Debido a la menor tasa de proliferación de las líneas humanas de mama de origen tumoral, los ensayos se realizaron usualmente durante 5-6 días con un cambio de medio cada 2-3 días.

Para el análisis de la proliferación celular total, las células fueron plaqueadas directamente en el medio completo correspondiente a cada línea celular y se realizaron los cambios de medio cada 2-3 días.

#### **7.4. Incorporación de timidina**

Las células ha ensayar fueron tripsinizadas y plaqueadas en placas de 96 pocillos a una densidad de  $10\text{-}15 \times 10^3$  células por pocillo (50-70% de confluencia) en medio DME/F12 conteniendo 5% de HS, 1  $\mu\text{g/ml}$  de insulina y 0.2  $\mu\text{g/ml}$  de hidrocortisona. Cada determinación fue realizada al menos por triplicado. Al día siguiente (las células alcanzan un estadio de quiescencia y una confluencia del 80-90%) el medio fue reemplazado por 100  $\mu\text{l}$

de DME/F12 sin rojo fenol suplementado con 0.5 mg/ml de BSA (medio BSA) durante 6-8 hs; posteriormente las células fueron lavadas con PBS e incubadas con 50  $\mu$ l de medio BSA:RPMI (1:1) suplementadas con el agente en estudio durante 16 hs. Al día siguiente, se adicionó 25  $\mu$ l del mismo medio conteniendo metil-[ $^3$ H]-timidina (concentración final: 5  $\mu$ Ci/ml) durante 5-8 hs. El ensayo se detuvo retirando el medio y agregando 10  $\mu$ l de cloruro de guanidinio 6M. Las células se lisaron completamente mediante un ciclo de congelación y descongelación. El ADN celular fue recogido en filtros Whatman GFC mediante un cosechador Nunc, lavados 8 veces con 0.3 ml de agua, fijados con etanol 96°, secados al aire y la radioactividad incorporada fue determinada en presencia de tolueno centelleante (4 g de PPO y 0.2 g de DiMePOPOP por litro de tolueno) en un contador  $\beta$  con una eficiencia del 50%.

### **7.5. Estudio de la expresión de proto-oncogenes**

Salvo que se especifique lo contrario, las células tripsinizadas fueron plaqueadas en medio completo en placas de cultivo de 20  $\text{cm}^2$  durante 3-4 días hasta que alcanzaran confluencia completa. En el caso de las MCF-10A o MCF-10T, equivale aproximadamente a  $2\text{-}3 \times 10^6$  células por placa. Alternativamente, se realizaron ensayos en placas de 50  $\text{cm}^2$  cuando se requería mayor número de células o en estudios diseñados con menor densidad celular.

Posteriormente se incubaron las células durante 16-24 hs en DME/F12 sin rojo fenol conteniendo 0.1 mg/ml de BSA (grado cultivo) y antibióticos (medio BSA), por el medio se reemplazó por DME/F12 sin rojo fenol durante 2 hs antes del tratamiento con los agentes a analizar. Estudios preliminares demostraron que este segundo cambio de medio mejora la inducción de los proto-oncogenes y que se obtienen similares resultados si se realiza este último cambio de medio con DME/F12 sin rojo fenol solo o con BSA.

### **7.5.1. Obtención del ARN**

Para células epiteliales con crecimiento en monocapa se utilizó el procedimiento descrito por Chomczynski P. y Sacchi N. (Chomczynski *et al.* 1987) con ligeras modificaciones. Las células fueron lisadas directamente en las placas (20 cm<sup>2</sup>) por el agregado de 400 ul de GIT (4M de tiocianato de guanidinio, 25 mM citrato de sodio pH 7, 0.5% sarcosil y 0.1 M de  $\beta$ -mercapto etanol). Luego de recoger el lisado en un tubo de microcentrífuga, se adicionó 40 ul de acetato de sodio 3M pH 4 y 400 ul de fenol (saturado con agua) con agitación vigorosa luego del agregado de cada reactivo hasta la formación de una sola fase. Por último se agregaron 120 ul de iAC (alcohol isoamílico:cloroformo 1:24) para separar las fases acousa y orgánica. La emulsión se incubó durante 10 min a 0°C y se centrifugó la muestra 15 min a 12.000g a 4°C. Se recuperó la fase superior (acuosa) y se procedió a precipitar el ARN por el agregado de 1 volumen de isopropanol, incubándolo 16 hs a 0°C. Luego de centrifugar por 15 min a 13.000g a 4°C, el ARN fue resuspendido en una solución libre de ARNasa con SDS 0.5%, EDTA 5 mM y cuantificado sobre una alícuota determinando su absorbancia a 260 nm. El rendimiento osciló normalmente entre 15 y 25 ug de ARN por millón de células y en general la relación de absorbancias 260nm/280nm fue superior a 2, lo que indica un ARN libre de proteínas. En los casos que se analizaron muestras de ARN polyA+, éste fue purificado a partir de ARN total utilizando columnas de oligo-dT-celulosa (QuickPrep mRNA Purification Kit, Pharmacia Biotech.)

### **7.5.2. Transferencia del ARN a membranas**

El ARN previamente obtenido fue desnaturalizado con Buffer de Siembra (50% formamida desionizada, 2.2 M formaldehído desionizado, 10 mM fosfato de sodio pH 7, 1 mM EDTA, 50 ug/ml de BrEtd, 5% glicerol y 0.01% de BPB) a 65°C durante 5 min, sembrado en un gel 1% agarosa conteniendo 0,8 M formaldehído desionizado, 10 mM fosfato de sodio pH 7 y 1 mM EDTA y separado electroforéticamente en buffer 10 mM fosfato de sodio pH 7, 1 mM EDTA con recirculación durante 5 hs a 40 mA (Fourney *et al.* 1988). Este procedimiento (en presencia de bajas concentraciones de formaldehído y con el agregado de BrEtd en el buffer de siembra) permite verificar: i) la cantidad de muestra

equivalente en cada calle, ii) la integridad de los ARNs (la ausencia de chorreado y bandas intermedias y la relación de intensidad 2:1 entre el ARN ribosomal mayor y el menor) y iii) la efectividad de la transferencia al filtro.

Salvo que se especifique lo contrario, la cantidad de ARN total sembrado por línea fue de 15 ug. Una vez verificada la integridad de los ARN por visualización con luz U.V. (300 nm), se transfirió a una membrana de nylon Zeta-probe (Bio-Rad) por medio de un sistema de transferencia por vacío Vacu-gene (Pharmacia-LKB).

Luego de optimizar este método de transferencia se optó por el siguiente protocolo: se hidroliza parcialmente el ARN "in situ" con NaOH 50 mM y NaCl 10 mM (10-15 min), se neutraliza el gel con Tris-HCl pH 7.8 100 mM, NaCl 10 mM (10-15 min) y se transfiere el ARN con SSC 10X (NaCl 1.5 M, citrato de sodio 0.15 M pH 7) durante 60-90 min con un vacío constante de 50 mmH<sub>2</sub>O. Luego de lavar brevemente el filtro con solución SSC 2X, se fijó el ARN a la membrana húmeda con luz U.V. (300nm) durante 3-5 min Posteriormente el filtro fue secado al aire y almacenado a 4°C hasta su hibridización.

### **7.5.3. Marcación radiactiva de las sondas**

Las sondas fueron marcadas por la técnica de "random primer" (Feinberg *et al.* 1983) utilizando kits comerciales (Bio Rad, BRL o Pharmacia) y dATP o dCTP-[<sup>32</sup>P] previa separación del fragmento de interés en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Feinberg *et al.* 1984). En general, la incorporación del dNTP-[<sup>32</sup>P] oscilaba entre 60-85% y los dNTPs no incorporados fueron separados por medio de una columna de Sephadex G-50 mediante la técnica de "spun column" descrita por Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.* 1989). La sonda así purificada fue desnaturalizada por calentamiento a 100°C durante 10 min, enfriada a 0°C e inmediatamente aplicada al buffer de hibridización. En todos los casos la actividad específica de la sonda fue >10<sup>9</sup> cpm/ug.

#### **7.5.4. Hibridización del ARN**

Se siguió el protocolo descrito por BioRad para las membranas de Nylon ZetaProbe. El filtro fue prehibridizado con Solución de Hibridización (50% formamida, 0.125 M fosfato de sodio pH 7, 0.25 M NaCl, 7% SDS y 8% PEG 4000) durante 30 min a 43°C en bolsas de polietileno o en tubos de hibridización. Posteriormente se agregó la sonda radiactiva desnaturalizada y se incubó a 43°C durante 16-24 hs. El filtro fue lavado a 43°C durante 10-15 min en cada una de las siguientes soluciones: SSC 2X-SDS 0.5% (una vez), SSC 0.5X-SDS 0.5% (dos veces) y SSC 0.2X-SDS 0.1% (dos veces). En caso de ser necesario, el último lavado se realizó a 60°C.

Los filtros fueron expuestos húmedos (protegidos por un film de polietileno) a una placa radiográfica con pantalla intensificadora a -70°C por 1-3 días y posteriormente revelados (Sambrook *et al.* 1989).

Cuando una misma serie de tratamientos debía ser analizada por hibridación con más de una sonda, se realizaron filtros por duplicado o, alternativamente, se procedió a deshibridizar el filtro incubándolo en SSC 0.05X, SDS 0.1% a 85-90°C durante 15-20 min previamente a su reutilización con otra sonda.

#### **7.6. Sondas utilizadas**

Para el análisis de los niveles de ARNm de los distintos proto-oncogenes estudiados en esta Tesis, se utilizaron las sondas descritas a continuación cedidas gentilmente por los siguientes investigadores, a quienes agradezco su colaboración:

*c-fos*: 1.8 Kb XhoI-EcoRI de pBK28 (cDNA humano). Dr. Inder Verma, The Salk Institute, CA, USA

*c-jun*: 1.8 Kb EcoRI de T7-jun (cDNA humano). Dr. Jim Woodgett, Ludwig Institute for Cancer Res. Londres, Inglaterra.

*c-myc*: 1.4 Kb ClaI-EcoRI de pHSR1 (porción del 3er exón y zona 3' genómica humana). ATCC.

*junB*, *junD*, *fosB*, *fra1* y *fra2* son fragmentos de cDNA humano completos en su región codificante. Dr. Rodrigo Bravo, Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Res. Inst., NJ, USA.

*c-H-ras*: 1.2 Kb EcoRI de pGST-Ras (cDNA humano). Dr Omar Coso, LCDO, NIDR-NIH, MY, USA

*gapdh*: 1.2 Kb PstI de pGAPDH (cDNA). Dr. Alberto Kornblihtt, INGEBI, Bs. As., Argentina.

### **7.7. Obtención de plásmidos**

Los vectores que portaban insertos o genes de interés fueron amplificados y analizados.

Para el primer paso, se introdujo el vector en bacterias competentes. Para obtenerlas se cultivaron bacterias *Escherichia Coli*, cepa HB101 o XL1 Blue (Stratagene, USA)) en medio LB (Bacto-tryptona 10 g/l, extracto de levadura 10 g/l, NaCl 10 g/l) hasta alcanzar una  $A_{600}$  de 0.6 (crecimiento exponencial). Se centrifugaron 50 ml de este medio a 3000g durante 10 min a 4°C y se decantó el sobrenadante. El pellet de bacterias se resuspendió en 10 ml de  $\text{CaCl}_2$  0.05 M estéril, incubándolo en hielo durante 20 min. Nuevamente las bacterias fueron concentradas por centrifugación, resuspendidas cuidadosamente en 2 ml de  $\text{CaCl}_2$  0.05 M estéril, fraccionadas en alícuotas de 0.2 ml y conservadas a 4°C para su transformación (en general antes de las 48 hs). En caso de no utilizarlas de inmediato, se agregó glicerol hasta un 15% y se almacenaron a -70°C. Si bien en estas condiciones las bacterias pueden ser utilizadas meses después, su eficiencia de transformación disminuye notablemente.

Para la transformación se mezclaron 200  $\mu\text{l}$  de bacterias competentes con 10-50 ng de plásmido superenrollado y se incubaron en hielo por 30 min, seguido por un shock térmico a 42°C durante 90 seg y se incubaron nuevamente en hielo por 5-10 min. Se agregó posteriormente 0.8 ml de medio LB y se incubaron sin agitación a 37°C para que las bacterias puedan expresar su gen de resistencia a antibióticos. Luego de una selección en placas de Petri con 1.5% de agar, medio LB y 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina (debido a que todos

los vectores utilizados portan el gen de resistencia a este antibiótico), las colonias resistentes se crecieron en 3-4 ml de medio LB conteniendo 40 ug/ml de ampicilina a 37 °C a 150-200 rpm en un agitador de aire durante 18 hs. Las bacterias se recolectaron por centrifugación a 5000 rpm durante 15 min y se resuspendieron en 200 ul de Solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA). Luego de incubar a temperatura ambiente durante 5 min, las bacterias se lisaron por agregado de 400 ul de Solución II (0.2 N NaOH, 1% SDS) recién preparada y se agitó suavemente por inversión para lograr la separación del ADN plasmídico. Se incubó 10 min a 0 °C y se precipitó el ADN cromosomal y las proteínas por el agregado de 300 ul de KAcO 3 M (pH 4.8) durante 20 min en frío. La muestra se centrifugó a 10000g durante 20 min, el sobrenadante conteniendo los plásmidos fue tratado con ARNasa A 100 ug/ml durante 30 min a temperatura ambiente, seguido por dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 y dos con éter etílico. El ADN plasmídico se precipitó por adición de 2 volúmenes de etanol. Luego de incubar 10 min a temperatura ambiente, se recuperó por centrifugación a 13000g durante 30 min. El precipitado se lavó con etanol 70% y resuspendió en TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM).

Los plásmidos así obtenidos fueron cortados con las enzimas de restricción adecuadas y analizados en geles de agarosa en buffer TAE (Tris-acetato 0.04 M pH 8, 1mM EDTA) en cubas para geles sumergidos (Aussubel 1989) corridos a 100 V, teñidos 15 min con solución 0.5 ug/ml de BrEtd, lavados durante 20-30 min con agua y visualizados por fluorescencia a la luz U.V. (300nm).

Para obtención de plásmido en mayor escala, las bacterias se crecieron en 100-200 ml de LB o TB con ampicilina y luego de centrifugarlas fueron resuspendidas en 1 ml de Solución I, siguiendo el mismo protocolo respetando la relación de volúmenes del resto de las soluciones. Luego de resuspender el precipitado etanólico en 300 ul de TE, se trasvasó la solución a un tubo de microcentrifuga, repitiéndose la precipitación etanólica en presencia de NH<sub>4</sub>AcO 2.5 M. Todos los protocolos descriptos fueron modificaciones de Sambrook J. et al. (Sambrook *et al.* 1989).

### **7.8. Ensayo cuantitativo de los sitios de unión del EGF**

Se cultivaron las células en placas de 24 pocillos durante 2-3 días hasta confluencia y se cambió a medio BSA 2-3 hs antes del tratamiento. Luego de tratar las células con PMA en las concentraciones y tiempos indicados para cada experimento, fueron lavadas con PBS e incubadas con 100.000 cpm/pocillo de  $^{125}\text{I}$ -EGF en medio DME/F12 con 1% BSA (grado para radioinmunoanálisis) durante 16 hs a 4°C según una modificación de (Koga *et al.* 1990). El  $^{125}\text{I}$ -EGF (A.E. 50uCi/ug y capacidad máxima de unión: 60%) fue preparado por el Dr. E. Charreau y cedido gentilmente por el Dr. L. Bussmann (IBYME). Posteriormente las células fueron lavadas 4 veces con 0.5 ml de PBS y lisadas en forma análoga a la utilizada para medir ADN. Estas muestras fueron analizadas en un contador g y en caso de ser necesario, los valores fueron normalizados respecto a su contenido de ADN. Los ensayos fueron hechos por triplicado. La unión inespecífica se determinó co-incubando con 100ug/ml de EGF no radiactivo. Se expresan los valores promedio y el error estándar de cada experimento.

### **7.9. Análisis de la activación de MAPk**

Se cultivaron las células en placas de 35mm de diámetro durante 2-3 días hasta un 70-95% de confluencia. Cinco horas antes del tratamiento, se cambió el medio de cultivo por medio BSA. Una vez concluido el tratamiento, se lisaron las células con 70-100 ul de solución de siembra 1X (Tris-HCl 65mM pH 6.8, SDS 2%, 2-MeOH y 10% glicerol) y se sonicaron para disminuir la densidad producida por el ADN cromosomal. La muestra fue calentada 5 min a 60°C, sembrada en un gel desnaturalizante de poliacrilamida 12% de 20 cm de largo y se realizó la electroforesis a 75V durante 18 hs según el método de Laemmli, U.K. (Laemmli 1970). La zona correspondiente a 25-50 Kdal (determinada por marcadores de pesos moleculares preteñido ) fue transferencia a una membrana de nitrocelulosa por acción de un campo eléctrico en un sistema TransBlot (BioRad) a 100V durante 1-1.5 hs.

Luego de corroborar la efectividad de la transferencia y que las muestras tuvieran cantidades similares de proteína mediante una breve tinción con Ponceau S, se bloqueó la membrana con 8% de leche en polvo descremada en TBS-T (Tris-HCl pH 7.6 20mM , NaCl



137 mM y Tween20 0.2%) durante 18 hs. Posteriormente la membrana fue incubada con un anticuerpo policlonal que reconoce las proteínas ERK-1 y -2 hecho en conejo y cedido gentilmente por el Dr. Silvio Gutkind (LCDO, NIDR-NIH, Bethesda, USA). El suero fue utilizado en una dilución 1:400 en TBS-T con 5% leche en polvo durante una hora. Luego de lavar profusamente con TBS-T la señal específica fue detectada mediante un anticuerpo anti conejo acoplado a peroxidasa el cual fue revelado por la técnica de quimioluminiscencia utilizando el sistema de Amersham siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **7.10. Ensayo de Western Blot**

Los ensayos de transferencia de proteínas a nirocelulosa y posterior detección por anticuerpos específicos se realizaron esencialmente como fuera descrito para la evaluación de la activación de MAPk. Las muestras se fraccionaron en minigeles (6 cm de largo) conteniendo 10% de acrilamida para el análisis de proteínas supresoras tumorales u 8% para la fosforilación en tirosina del receptor de EGF.

Para estudiar los niveles de los productos de genes supresores tumorales se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales en forma de sobrenadante de cultivo de hibridomas: pAB240 (contra p53 mutada) cedido gentilmente por el Dr. David Lane (Imperial Cancer Res. Fund., UK), pAB421 (contra todo tipo de p53), X77 y X161 (contra p105Rb), cedidos gentilmente por el Dr. Ed Harlow (Cold Spring Harbor Lab. NY, USA). Todos éstos fueron diluidos 1:1 con solución de bloqueo para su incubación con las membranas.

El anticuerpo monoclonal purificado PY-20 (Zymed Lab., USA) fue utilizado para reconocer residuos de fosfotirosina en el receptor de EGF. La dilución de trabajo utilizada fue 1:1000.

### **7.11. PCR del gen *H-ras***

Se aisló ADN genómico a partir de células MCF-10A y MCF-10T lisando las células en buffer Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 0.5% y proteinasa K 100 ug/ml incubando 16 hs a 50°C. Posteriormente se desproteinizó la muestra por medio de

extracciones orgánicas con fenol:iAC y con iAC. Por último el ADN fue precipitado con etanol en las mismas condiciones que el ADN plasmídico y resuspendido en una solución con Tris-HCl 10 mM (pH 7.8), EDTA 0.1 mM. Todos los pasos se realizaron con agitación energética sin necesidad de mantener al ADN genómico como una entidad intacta de alto peso molecular.

Los “primers” utilizados para la amplificación del H-ras, cedidos por el Dr. José Russo (Fox Chase Cancer Center, Filadelfia, USA), poseen la siguientes secuencias:

hHR/a+ : 5' CGA TGA CGG AAT ATA AGC TTG TGG TGG T 3'

hHR/d- : 5' GTT CAC CTG TAC TGG TGG AAT TCC TCA AA 5'

El primer hHR/a+ comienza dos nucleótidos antes del sitio AUG de iniciación de la traducción mientras que el hHR/d- se extiende hasta 5 nucleótidos posteriores al fin del exón 2 del gen de *H-ras* humano. (Ver mapa en **Resultados: Análisis del gen *H-ras***)

La reacción de PCR se llevó a cabo en un equipo Perkin Elmer (USA) en 100 µl de volumen de reacción conteniendo 2 µg de ADN genómico o 0.1 ng de plásmido pT24, 100 µM de dNTPs, 1 µM de cada primer, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U de Taq polimerasa (Promega) en su buffer de reacción. La muestra fue desnaturalizada durante 5 min a 95°C antes de agregar la polimerasa y se amplificó con 30 ciclos de 95°C por 5 min (desnaturalización), 60°C por 2 min (formación del híbrido), 68°C por 2 min (elongación) y por último se realizó una incubación a 72°C durante 10 min.

El producto de PCR fue directamente digerido con la enzima de restricción MspI en las condiciones adecuadas y analizado en geles de agarosa.

### **7.12. Análisis y representación gráfica de las autoradiografías**

Las radiografías provenientes de los ensayos de Northern o Western blot fueron exploradas con un Scanner Avec Colour 2400 perteneciente al Dr. J.C. Calvo. Las figuras archivadas en formato adecuado fueron procesadas para mejorar el brillo y el contraste mediante programas utilitarios específicos y luego de añadir las correspondientes leyendas, se

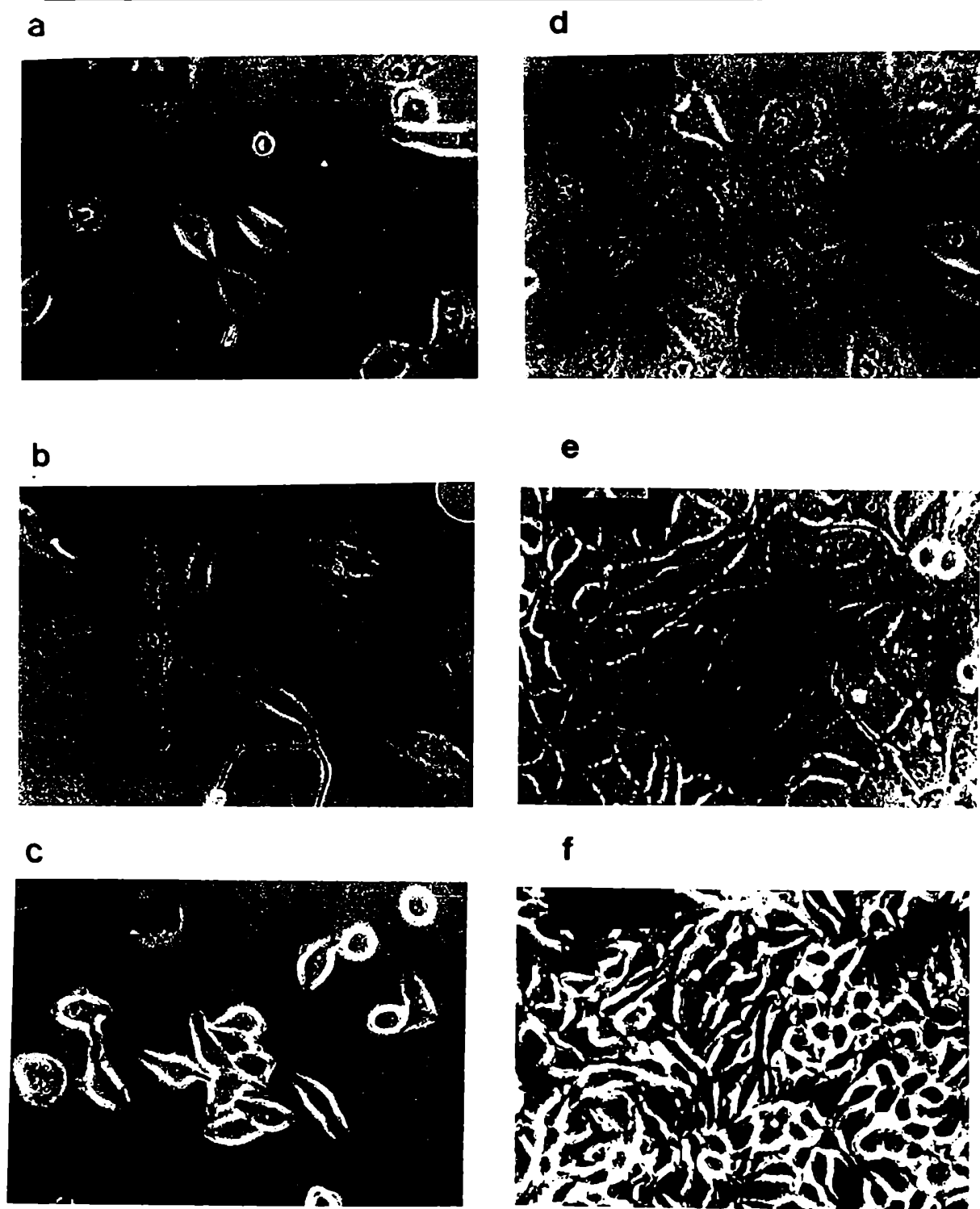
incluyeron en el texto de la Tesis y se imprimieron directamente con una impresora laser. En el caso de los análisis densitométricos, los archivos escaneados fueron analizados por medio del programa ImageQuant y los valores obtenidos fueron corregidos por los valores de background y estandarizados eventualmente por el gen control *gapdh*

## 8. RESULTADOS

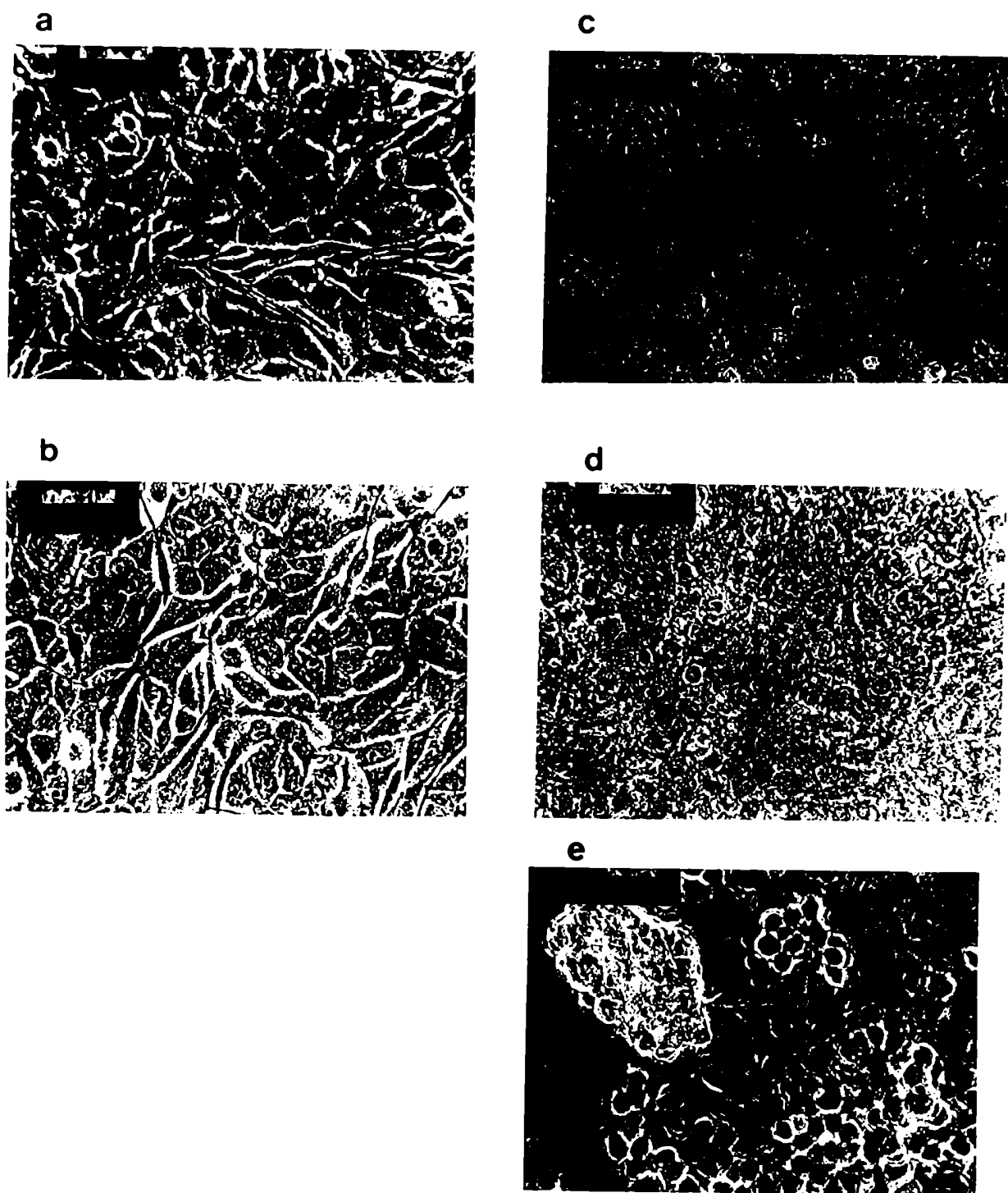
### 8.1. Caracterización celular y molecular de las líneas MCF-10A y MCF-10T

Como fuera descripto anteriormente, la línea MCF-10A proviene de la inmortalización espontánea de un cultivo de tejido mamario humano no tumorigénico. Morfológicamente se presentan como células planas regulares, con una gran adherencia a la placa de cultivo (Fig. 3a). Producto de la transformación por el oncogén *H-ras*, las células MCF-10T, son planas, ligeramente más grandes que las MCF-10A, pero con una morfología más irregular cuando se encuentran a baja densidad (Fig. 3b). La estructura celular de ambas líneas (similar a la línea no tumorigénica HBL-100) contrasta con la de líneas provenientes de tejidos tumorales. Estas últimas poseen una estructura refringente más redondeada debido a la menor adherencia por el sustrato de anclaje. La Fig. 3c muestra un ejemplo de la morfología de la línea MCF-7. Otras líneas tumorales de mama como las MDA-453 o las SKBR3 presentan una estructura similar.

Conforme las células proliferan, tanto la MCF-10A como MCF-10T cubren completamente el sustrato de cultivo (alcanzan un 100% de confluencia) con una densidad celular de 40.000-60.000 cél/cm<sup>2</sup> y una morfología regular poliédrica (Fig. 3d y 3e), diferente a la de MCF-7 (Fig. 3f). En dichas condiciones, estas células mantienen aún la capacidad de dividirse modificando su estructura (MCF-10T presenta una morfología más cuboide con focos de crecimiento de células ahusadas) y alcanzan densidades celulares del orden de 80.000-120.000 cél/cm<sup>2</sup> aunque siempre en disposición de monocapa (Fig. 4a y 4b). Cuando se sobrepasa esta densidad celular, comienza a deteriorarse la estructura de la membrana, las células entran en senectud y finalmente mueren. Si no se renuevan constantemente los nutrientes, la línea transformada MCF-10T puede sobrevivir más tiempo que las MCF-10A en estas condiciones (Fig. 4c y 4d). Por el contrario, otras líneas provenientes de tumores que no requieren anclaje sólido para crecer (MCF-7, SKBR3, MDA-453), son capaces de proliferar en forma estratificada, alcanzando densidades superiores a las 200.000 cél/cm<sup>2</sup> conservando su viabilidad (Fig. 4e).



**Fig. 3.** Microscopía por contraste de fase de células MCF-10A (a y d), MCF-10T (b y e) y MCF-7 (c y f) a baja densidad celular (a-c) o a confluencia (d-f).



**Fig. 4.** Microscopía por contraste de fase de células MCF-10A (a y c), MCF-10T (b y d) y MCF-7 (e) en quiescencia por alta densidad celular (a y b) o a mantenidas a muy alta densidad celular (c-e).

Para verificar la identidad de la línea MCF-10T y su diferencia con la MCF-10A, se analizaron diversos parámetros:

a) dado que MCF-10T es el producto de una co-transfección estable de MCF-10A con *H-ras* (gen transformante) y neomicina fosfotransferasa (gen de selección), analicé la resistencia al antibiótico G418 (neomicina para eucariotes). En la Fig. 5 se aprecia que las células MCF-10A son sensibles al G418 mientras que las MCF-10T proliferan aún en presencia de altas dosis de este antibiótico (400 ug/ml de droga activa)

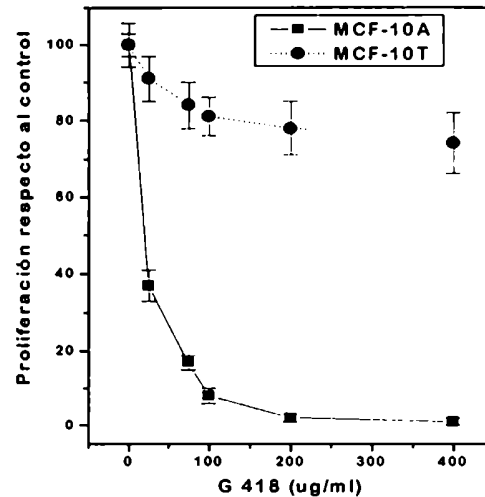


Fig.

5. Proliferación de células MCF-10A y MCF-10T en presencia de G-418

b) se analizó la presencia del gen *H-ras* mutado por la técnica de PCR. Los codones 11-12 del gen *H-ras* normal (GCC GGC (Ala-Gli)) poseen la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *MspI* (CCGG). Cualquier mutación en alguno de estos nucleótidos, como la que se encuentra en el oncogén T24 *H-ras*, eliminaría dicho sitio de restricción (ver Fig. 6). Por medio de "primers" específicos amplifiqué una secuencia de 565 bp a partir de ADN de ambas líneas celulares y de un plásmido conteniendo el gen T24 *H-ras* como control. Como se observa en Fig. 7. La digestión con *MspI* generó una banda de 355 bp a partir del material amplificado proveniente de las células MCF-10A, mientras que en el caso de MCF-10T aparecen fragmentos de 355bp (alelos celulares normales) y 389 bp (transgén mutado). El plásmido control T24 *H-ras* produce únicamente el fragmento de 389 bp debido a la mutación descrita anteriormente.

### Mapa parcial del gen H-ras

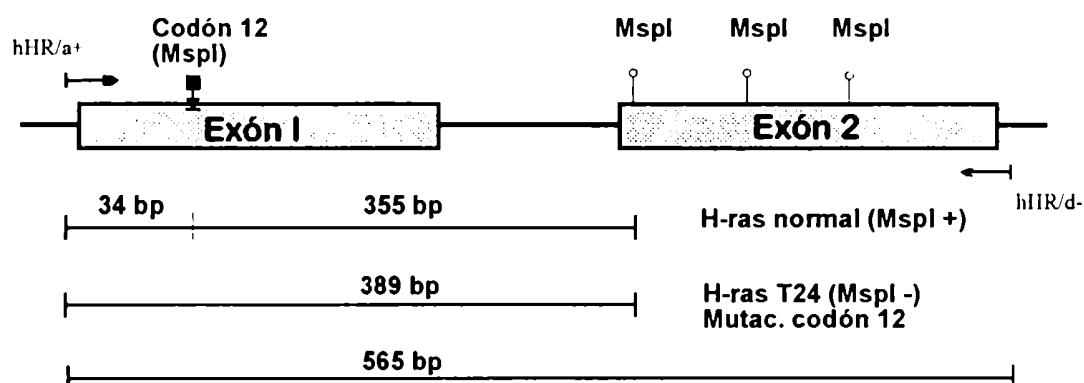


Fig. 6. Mapa del gen *H-ras*.

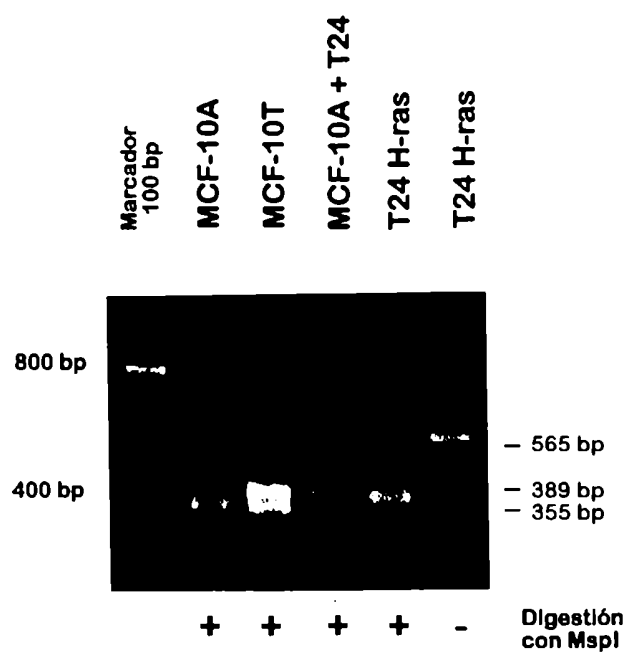


Fig. 7. Análisis por PCR de la mutación en el codón 12 del oncogén *H-ras*.



c) una vez demostrada la presencia de T24 *H-ras* en las MCF-10T, procedí a determinar el nivel de ARNm del *H-ras*. En la Fig. 8 se observa la sobreexpresión de este gen en la línea MCF-10T respecto de MCF-10A al hibridar ARN poliA<sup>+</sup> de células en estado proliferativo con una sonda de ADNc de *H-ras*. La sonda utilizada no es capaz de discriminar entre el *H-ras* normal y su variante mutada, pero debido al origen de la línea MCF-10T y a que el oncogén *H-ras* se encuentra regulado por un promotor de expresión constitutiva fuerte (SV40), es lógico suponer que la sobreexpresión se debe al transgén T24 *H-ras*. También se aprecia que otras líneas celulares tumorigénicas de mama humana no expresan niveles detectables de este gen. En la misma figura se observa que tanto MCF-10A como MCF-10T expresan en condiciones proliferativas niveles elevados de ciertos proto-oncogenes nucleares como *c-myc* y *junB* respecto de dos líneas celulares transformadas: MCF-7 y MDA-453. Asimismo, no se detectan niveles de *c-fos* o *fosB* en ninguna de las células proliferantes analizadas. Estos proto-oncogenes nucleares serán analizados en detalle más adelante.

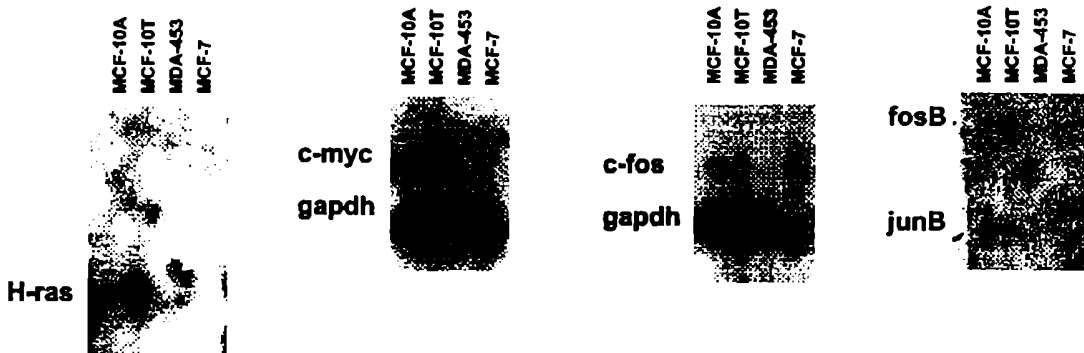
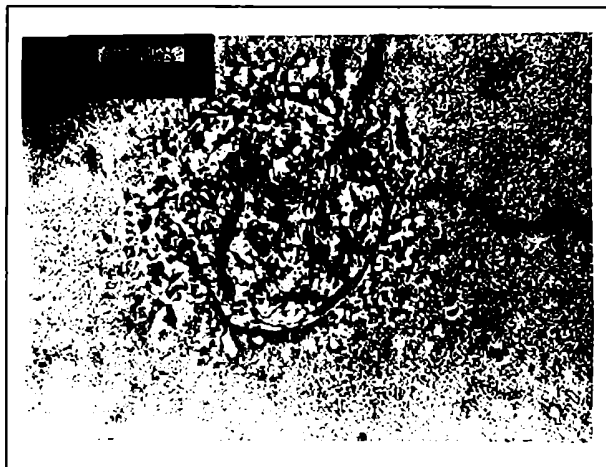


Fig. 8. Expresión de oncogenes en células en proliferación.

d) Se analizó también la capacidad de MCF-10T de crecer en un medio semisólido. Después de 14 días, se observaron colonias en los cultivos de MCF-10T (Fig. 9) mientras que las MCF-10A no fueron capaces de proliferar en estas condiciones. Es necesario destacar que las MCF-10T producen focos de crecimiento en el orden de 2-5% del total de células plasmadas, en comparación con el 50-70% que proliferan en cultivos de MCF-7, lo

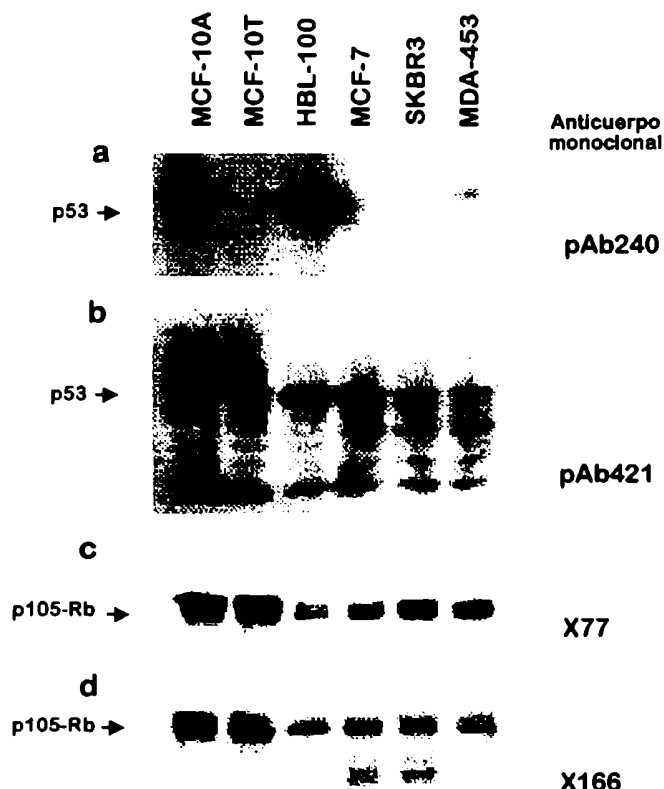
cual podría deberse al origen no clonal de esta línea celular o que el oncogén *H-ras* no es capaz de activar todos los mecanismos de transformación que presenta una célula de origen neoplásico.



**Fig. 9.** Colonia de MCF-10T proliferando en agar semisólido.

### **8.2. Estudio del nivel de proteínas supresoras tumorales en líneas celulares de mama humana.**

Al analizar el nivel de los productos proteicos codificados por ciertos genes supresores tumorales se observa que solo HBL-100 sobreexpresa la proteína p53 y que la proteína proveniente de esta línea celular es detectada por el anticuerpo monoclonal pAb240, que solo reconoce ciertas formas mutadas de p53, mientras que el anticuerpo pAb421 muestra niveles basales de p53 en todas las líneas estudiadas (Fig. 10a y 10b). Por el contrario, el producto del gen supresor tumoral Rb, se encuentra en cantidades levemente mayores en las líneas del linaje MCF-10 respecto las líneas provenientes de tumores de mama, mientras que HBL-100, no tumorigénica, expresa niveles bajos de dicha proteína. Este resultado fue determinado con dos anticuerpos monoclonales distintos que reconocen a p105<sup>Rb</sup>, el X77 y el X161, ambos cedidos generosamente por el Dr. Ed Harlow (Fig. 10c y 10d)

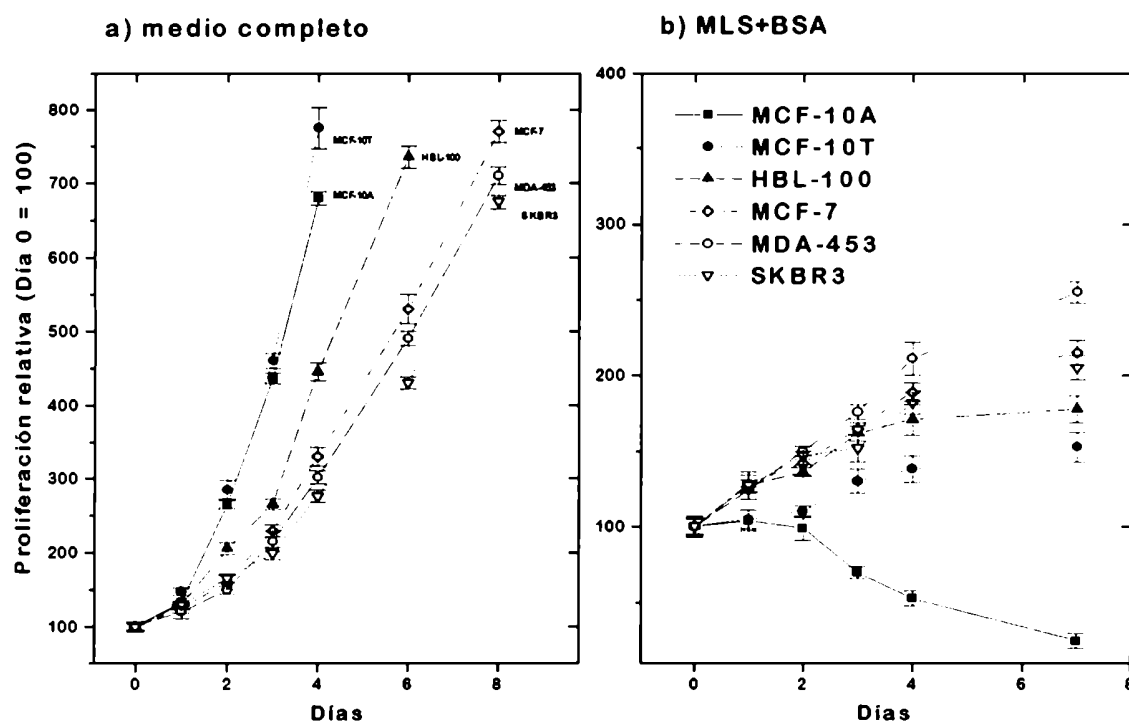


**Fig. 10.** Niveles de proteínas codificadas por genes supresores tumorales en diversas líneas celulares de mama humana.

### 8.3. Estudios de proliferación de diversas líneas celulares provenientes de tejido mamario humano.

Las líneas MCF-10A y MCF-10T poseen similares niveles de proliferación cuando son crecidas en medio completo con un tiempo de duplicación aproximado de 24-30 hs. A pesar de provenir de tejido mamario normal, ambas líneas proliferan con mayor velocidad que las diversas líneas estudiadas obtenidas a partir de tejido neoplásico, como las MCF-7, MDA-453 o SKBR3, las cuales poseen un tiempo de duplicación que varía entre 60-80 hs. La línea HBL-100, obtenida a partir de leche de una mujer aparentemente normal, pero que contiene información genética de SV40, posee una velocidad de replicación menor que la serie MCF-10 pero superior a las líneas tumorigénicas (tiempo de duplicación: 45-50 hs). En la Fig. 11a se observa una cinética de proliferación de estas líneas celulares en sus

respectivos medios completos, es decir, el medio en el que se las cultiva rutinariamente. Sin embargo, las líneas provenientes de tejido mamario normal requieren cualitativa y cuantitativamente mayores nutrientes que las líneas tumorigénicas pues estas últimas son capaces de proliferar, aunque a un ritmo menor, en ausencia de los agentes mitogénicos presentes en el suero fetal bovino (FCS), mientras que las líneas provenientes de tejido normal proliferan muy lentamente (MCF-10T) o directamente mueren en ausencia de nutrientes exógenos (MCF-10A). En la Fig. 11b se ejemplifica la proliferación de estas líneas celulares mamarias humanas mantenidas en medio libre de suero (MLS) conteniendo 1 mg/ml de BSA y 0.1% de FCS.

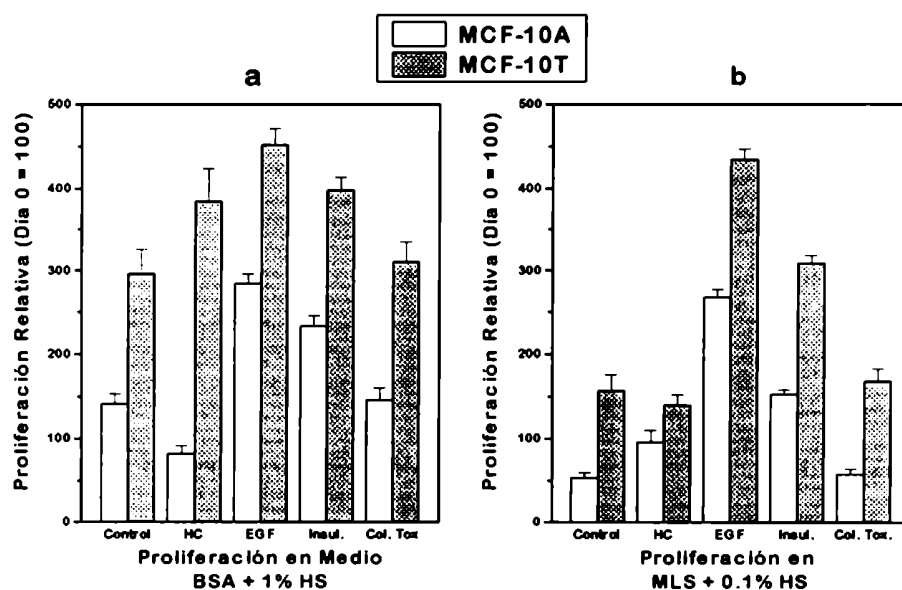


**Fig. 11.** Proliferación de líneas celulares de mama humana en medio rico (a) o carente (b) en factores de crecimiento.

#### 8.4. Influencia de diversos agentes sobre la proliferación de las líneas celulares MCF-10A y MCF-10T

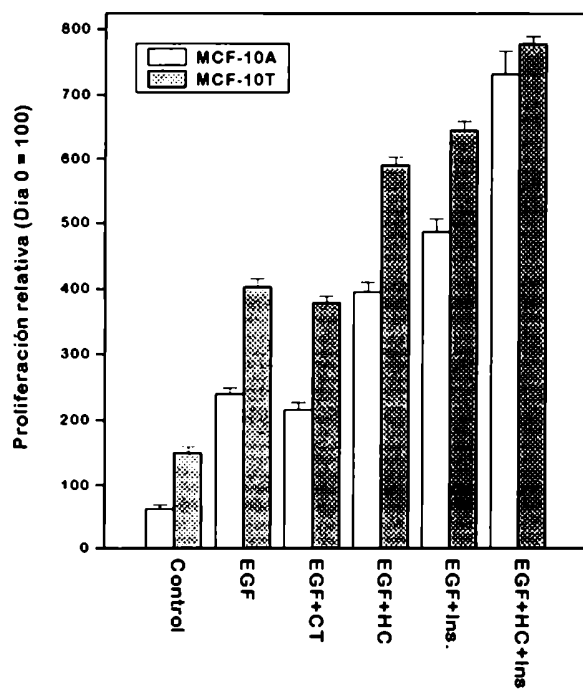
Se analizó la capacidad proliferativa de estas líneas celulares ante el estímulo de diversos agentes. En principio, procedí a estudiar los diversos componentes con los que se suplementa el medio de cultivo en el que se mantienen normalmente estas líneas celulares.

En medio BSA (ver Materiales y Métodos) conteniendo 1% de suero equino (HS), la línea MCF-10T exhibe una notable capacidad proliferativa independientemente de los factores agregados al medio, mientras que MCF-10A responde a la presencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (10 ng/ml) y a la insulina (5 ug/ml - dosis suprafisiológica) pero no es afectada por la hidrocortisona (0.5 ug/ml) ni la toxina colérica (100 ng/ml) (Fig. 12a). En estos experimentos, el suero equino fue disminuído para no enmascarar la acción de los agentes en estudio. Cuando estas células son crecidas en MLS (un medio libre de suero y proteínas) con una muy baja cantidad de HS (0.1%) ambas líneas son capaces de responder a los estímulos del EGF o la insulina aunque las MCF-10T exhiben un crecimiento basal mayor que las MCF-10A, las cuales no pueden proliferar y, por ende, sobrevivir en un medio sin nutrientes (Fig. 12b).



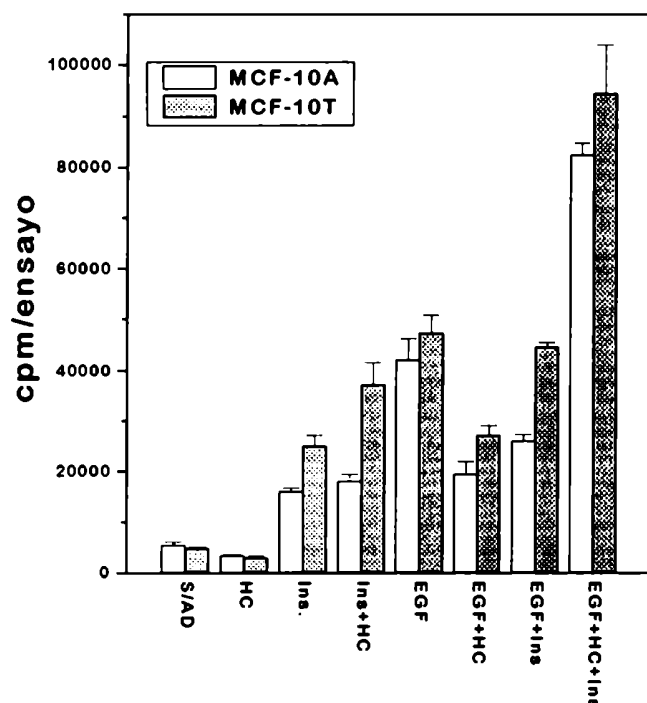
**Fig. 12.** Proliferación de células MCF-10A y MCF-10T bajo la inducción de diversos agentes.

Las dos líneas celulares estudiadas poseen un alto número de receptores para el factor de crecimiento epidérmico (aproximadamente 100.000 sitios de unión por célula) (Basolo *et al.* 1992) el cual genera un notable estímulo mitogénico en estas células. Si bien ambas líneas son crecidas normalmente en medio DME/F12 suplementado con suero equino 5%, EGF 10 ng/ml, insulina 5 ug/ml, hidrocortisona 0.5 ug/ml, toxina colérica 100 ng/ml y antibióticos, el EGF representa el agente mitogénico individual por excelencia, atribuyéndosele alrededor del 50% del efecto estimulatrio proliferativo en estas líneas celulares (especialmente en las MCF-10A) en presencia de medio completo. Si bien la insulina a altas dosis posee una capacidad mitogénica que equivale al 50-70% del EGF a concentraciones 500 veces menores y la hidrocortisona no es mitogénica *per se*, la combinación de estos factores potencian el efecto del EGF lográndose una estimulación máxima cuando los tres compuestos son aplicados conjuntamente. Estos resultados se observan en la Fig. 13 en donde las células fueron cultivadas en MLS conteniendo 0.1% de suero equino.



**Fig. 13.** Proliferación de células MCF-10A y MCF-10T bajo la acción combinada de diversos agentes.

Por otra parte, se determinó la influencia de diversos agentes en estudio en cuanto a la capacidad para inducir la entrada en la fase S del ciclo celular en las líneas MCF-10A y MCF-10T. La Fig. 14 muestra que tanto el EGF como la insulina inducen la síntesis de ADN en ambas líneas celulares como se deduce a partir del incremento en la incorporación de metil-( $^3\text{H}$ )-timidina en el ADN de células tratadas con dichos agentes. Es necesario señalar que el efecto potenciador de la proliferación debido a la adición de más de un agente solo se observa cuando actúan conjuntamente el EGF, la insulina y la hidrocortisona.



**Fig. 14.** Inducción de la síntesis de ADN en células MCF-10A y MCF-10T bajo la acción de diversos agentes.

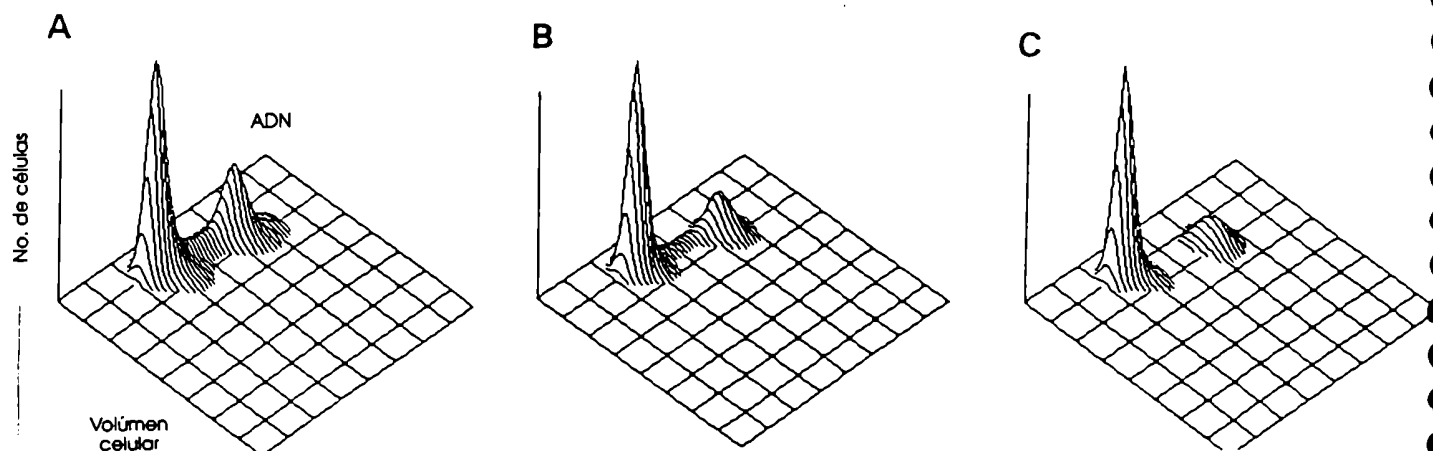
### **8.5. Estudio de la expresión de proto-oncogenes nucleares en las líneas celulares MCF-10A y MCF-10T**

Las diversas familias de proto-oncogenes nucleares forman parte del grupo de genes de inducción temprana y actúan como el último eslabón en la cadena de señales mitogénicas desde la membrana celular al núcleo. Una vez activadas por estas señales, se asocian con diversas proteínas y se unen a sitios específicos en los promotores de ciertos genes,

induciendo la expresión de los mismos. Las proteínas codificadas por dichos genes son necesarias para que la célula activada prosiga su camino a través del ciclo celular y finalmente pueda dividirse. Dada su importancia en la regulación de los mecanismos de proliferación celular, procedí a estudiar la cinética y capacidad de inducción de los representantes más importantes de diversas familias de proto-oncogenes nucleares.

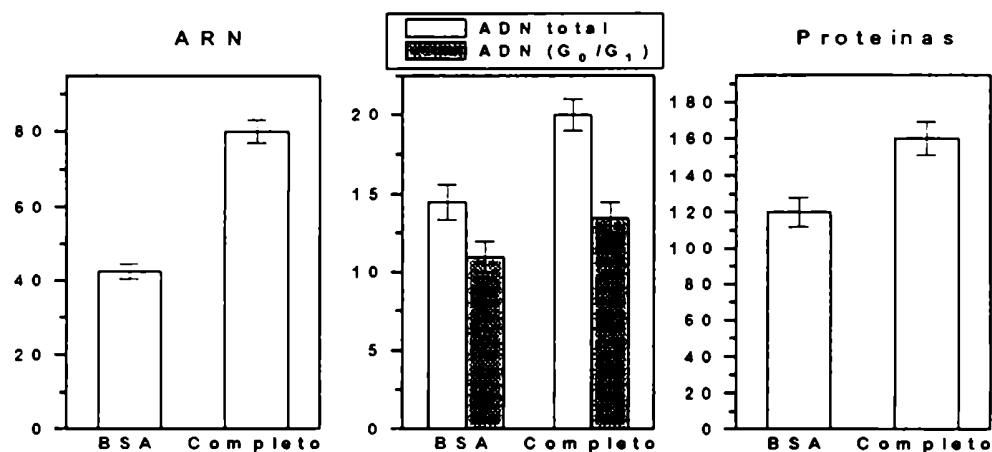
Debido a que la inducción de proto-oncogenes de la familias Fos o Jun solo se observa cuando la célula entra en las primeras fases del ciclo celular (transición  $G_0 \Rightarrow G_1$ ) (Cohen *et al.* 1989), fue necesario sincronizar las células en el estadio de quiescencia. Para ello recurrí a la inhibición por contacto observable en condiciones de elevada densidad celular y a la acción conjunta de la privación de agentes mitogénicos (incubación de 16-24 hs en medio-BSA). En la Fig. 15 se observa un análisis por FACS (separación celular activada por fluorescencia) en la cual la línea MCF-10A en crecimiento continuo presenta un 21% de células en fase S y un índice mitótico (IM) (porcentaje de células en fase S+G2/M) del 43% (Fig. 15a) mientras que en células en confluencia la fracción S desciende al 7% (IM: 27%) (Fig. 15b) y en células no confluentes (60-80%) incubadas 16 hs en medio-BSA, la fracción S es del 4% (IM: 22%) (Fig. 15c) lo cual indica que ambos tratamientos previenen la proliferación celular continua. Además, estos resultados revelan que el contenido total de ADN no se aparta notablemente de la diploidía normal como ya fuera descrito por Soule *et al.* (Soule *et al.* 1990). Para establecer si además de frenar el crecimiento, la incubación en medio-BSA afectaba otros parámetros celulares, determiné los niveles de proteínas, ARN y ADN en células MCF-10A mantenidas en presencia de medio completo o tratadas 18 hs en medio BSA. LA Fig. 16 muestra que en ausencia de mitógenos externos la cantidad de ARN total o de proteínas es menor que en células en crecimiento continuo. Como es lógico de esperar, los niveles de ADN total corregidos a la fase  $G_0$ - $G_1$  (usando los valores de IM descriptos anteriormente) no se modifican con los tratamientos utilizados.





**Fig. 15.** Análisis por FACS del estadio celular de la línea MCF-10A en distintas condiciones de cultivo.

- a) Células en proliferación (confluencia: 50-70%)
- b) Células en alta densidad celular (confluencia: 100%)
- c) Células cultivadas 20 hs en medio BSA (confluencia: 50-70%)



**Fig. 16.** Niveles de ARN, ADN y proteínas en células MCF-10A cultivadas en medio completo o en medio BSA. Valores expresados en ug/ 10<sup>6</sup> cél.

En la Tabla I se aprecia el contenido relativo de ADN en las diversas líneas celulares de mama estudiadas en condiciones de proliferación continua. Los valores de ADN total obtenidos en MCF-10A, distinto del descripto generalmente para células diploides de mamífero (aproximadamente 6 pg/cél.), puede deberse a la diferencia entre el ADN usado como control para la calibración de la curva (ADN purificado de timo de ternero) respecto del ADN proveniente de un extracto celular crudo y a la metodología empleada en su determinación

**Tabla I.** Contenido de ADN en líneas celulares de mama humana

Línea celular	pg ADN / cél.
MCF-10A	20.2 ± 1.1
MCF-10T	29.2 ± 1.8
MCF-7	43.5 ± 3.0
SKBR3	36.9 ± 2.5
MDA-453	41.6 ± 1.9
MDA-231	32.7 ± 2.9

### **8.6. Cinética de activación de proto-oncogenes nucleares**

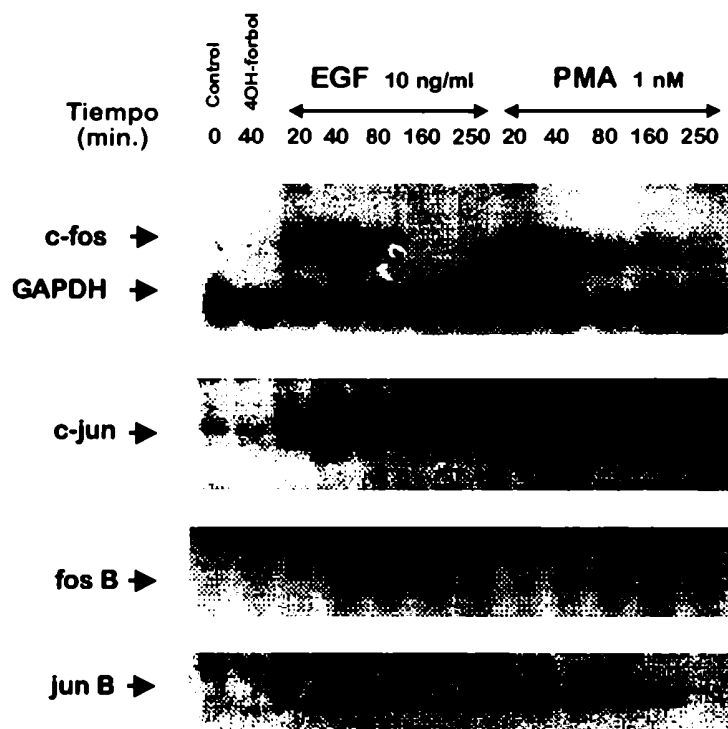
Una vez comprobadas las condiciones necesarias para inducir un estado transitorio de quiescencia, procedí a analizar la cinética de expresión de diversos proto-oncogenes nucleares bajo la acción del EGF y del promotor tumoral PMA. Este último actúa mimetizando la acción del diacilglicerol (DAG), activando la proteína kinasa C (PKC) y es un inductor general de diversos genes de expresión temprana en una amplia gama de linajes celulares. En condiciones proliferativas, ni las células provenientes de mama normal (MCF-10) ni las obtenidas a partir de tumores de mama (MCF-7 y MDA-453) expresan niveles detectables del gen *c-fos* (ver Fig. 8 en **Caracterización celular y molecular de las líneas**

**MCF-10A y MCF-10T).** Es necesario destacar que en ensayos preliminares, el EGF fue capaz de inducir la expresión de *c-fos* en células MCF-10A y MCF-10T en elevada confluencia independientemente de que las células hallan sido preincubadas en un medio con nutrientes (medio HS) o sin ellos (medio BSA). Sin embargo los cultivos a baja densidad celular no son capaces de expresar *c-fos* ante el mismo estímulo mitogénico del EGF aún si se preincuban 20 hs en medio sin factores de crecimiento (medio BSA) (datos no mostrados). De todas formas, las condiciones generales de análisis de los proto-oncogenes nucleares fueron realizadas en células quiescentes por alta densidad celular previamente incubadas 16-24 hs en medio BSA.

En las Fig. 17a y 17b se observa que los genes *c-fos*, *c-jun*, *fosB* y *junB* exhiben cinéticas de activación particulares para cada uno de los genes pero con patrones similares entre las dos líneas celulares y los dos agentes estudiados. El proto-oncogén *c-fos* muestra una cinética más rápida siendo máxima su expresión alrededor de los 40 min, retornando a valores basales luego de 80 min de tratamiento con EGF. Se distingue un leve efecto más prolongado del PMA respecto del EGF aunque lejos del máximo alcanzado a los 40 min. De este modo, no se observan diferencias significativas en la máxima estimulación entre ambas líneas celulares o entre los dos tratamientos.

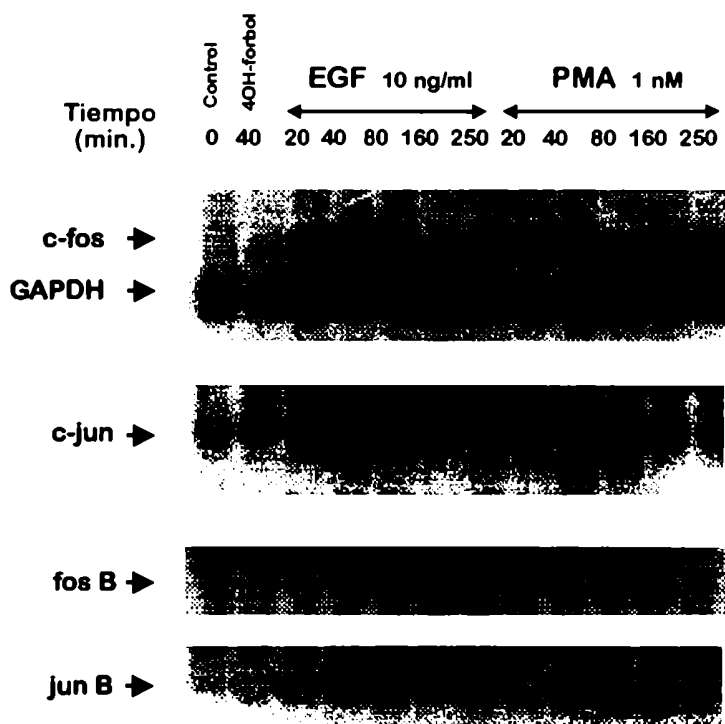
En el caso del *c-jun*, la inducción de su ARNm es similar a *c-fos* (aunque partiendo de un nivel basal más elevado) alcanzando valores máximos entre los 40-80 min. En MCF-10A se aprecia que el efecto del EGF o del PMA se prolonga temporalmente a niveles aparentemente superiores a los de MCF-10T. Ver más adelante un estudio mas detallado de la cinética de activación de estos dos genes.

Los genes *fosB* y *junB* poseen cinéticas de estimulación similares a *c-jun* pero partiendo de niveles basales indetectables. Es evidente que en ambos genes el PMA produce un efecto más duradero que el EGF en ambas líneas celulares.



**Fig. 17.** Cinética de expresión de proto-oncogenes nucleares bajo la acción de EGF o PMA en células MCF-10A (a) y MCF-10T (b).

**a) MCF-10A**

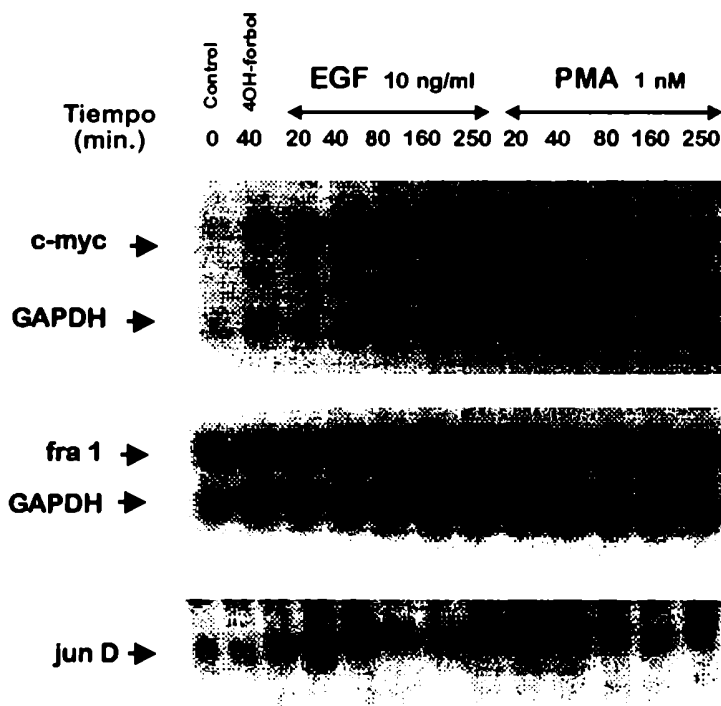


**b) MCF-10T**

En las condiciones generales utilizadas para analizar la inducción de los proto-oncogenes nucleares, el *c-myc* suele exhibir un nivel basal elevado y por lo tanto no se aprecian correctamente las variaciones en sus niveles de ARNm (ver **Regulación del gen *c-myc***). De todas formas, se observa un leve efecto inductorio del EGF y del PMA que alcanza su máxima expresión entre los 80 y 160 min post tratamiento persistiendo hasta los 250 min (Fig. 18a y 18b).

En la misma figura se aprecia que *jund*, generalmente descripto como poco regulable en sus niveles de ARNm a través del ciclo celular, presentó un muy leve incremento sobre su basal por acción del EGF o el PMA siendo este aumento más notorio en la línea MCF-10T que en MCF-10A.

Otros genes, como el *fra-1*, se expresan en forma abundante y no se observaron variaciones en sus niveles por el agregado de EGF o PMA en los tiempos estudiados (Fig. 18a y 18b).



**Fig. 18.** Cinética de expresión de proto-oncogenes nucleares bajo la acción de EGF o PMA en células MCF-10A (a) y MCF-10T (b).

**a) MCF-10A**

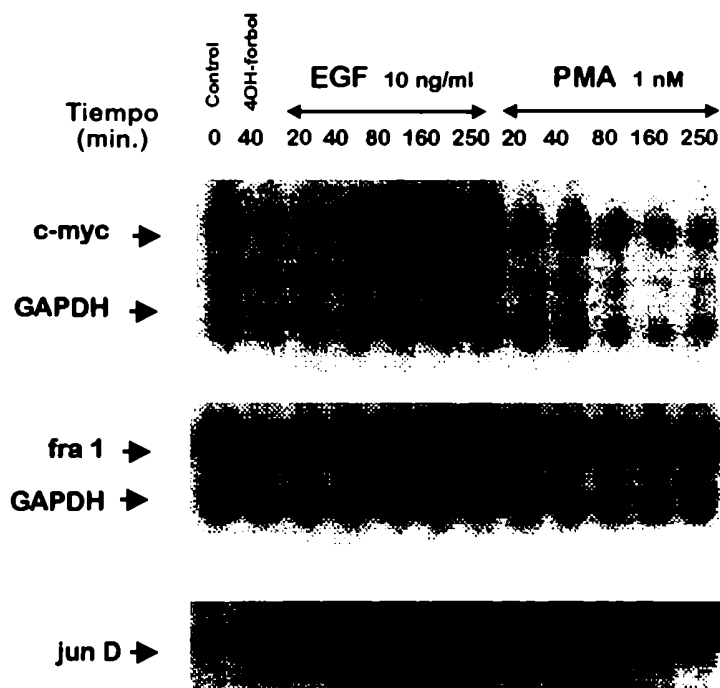
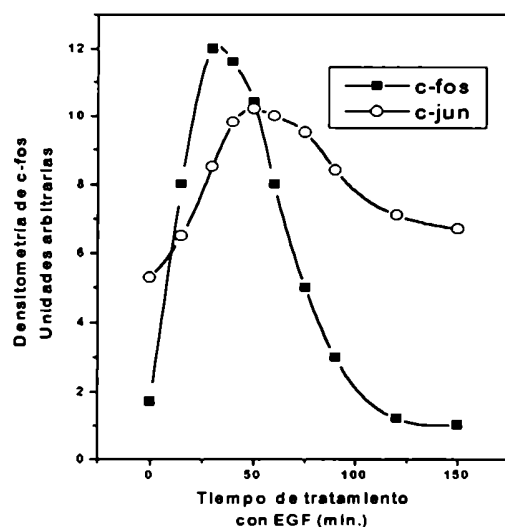


Fig. 18b.

b) MCF-10T

Fig. 19. Análisis densitométrico de la inducción de *c-fos* y *c-jun* por EGF.

En la Fig. 19 se observa un análisis densitométrico de una cinética más detallada de la inducción de *c-fos* y *c-jun* mediada por EGF en la línea celular MCF-10A. Es evidente que el nivel de ARNm de *c-fos* experimenta un notable incremento respecto de su nivel basal, alcanzando su máxima expresión 30-45 min luego de la inducción, para retonar a sus

niveles basales en los siguientes 45-60 min. Por otra parte, los niveles basales de *c-jun* son elevados, razón por la cual el estímulo máximo, que se alcanza alrededor de 40 min post

tratamiento, no supera el 200% sobre el nivel basal. A diferencia de *c-fos*, estos valores permanecen elevados al menos 30 min más antes de comenzar a decaer.

Nuevamente, es necesario recalcar que ambas líneas celulares, MCF-10A y MCF-10T, poseen cinéticas y niveles de activación luego de la inducción con EGF o PMA similares entre sí. Cabe destacar además que el 4 $\alpha$ OH forbol, un análogo inactivo (no esterificado) del PMA, no produjo estimulación significativa en ninguno de los genes analizados.

Por otra parte, varios de los proto-oncogenes estudiados poseen los mecanismos de regulación clásicos que han sido descriptos en diversos modelos de estudio (ver **INTRODUCCIÓN**) como ser:

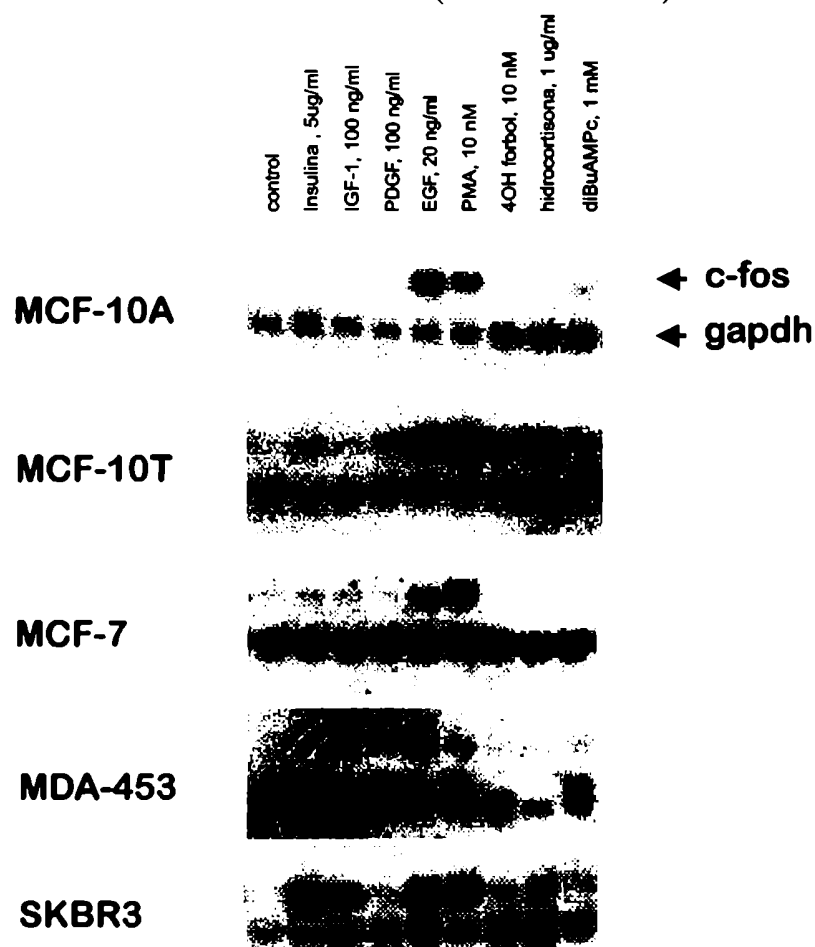
- i) sobre expresión por acción de un bloqueante de la síntesis proteica como la cicloheximida (estudiado en los genes *c-fos*, *c-jun* y *c-myc*)
- ii) incapacidad de reinducción hasta el inicio de un nuevo ciclo celular (estudiado en *c-fos*) (datos no mostrados).

### **8.7. Análisis de la expresión del proto-oncogén *c-fos* bajo la acción de diversos agentes**

Una vez demostrada la inducibilidad del gen *c-fos* y habiendo estudiado su cinética de reacción, procedí a analizar la expresión de dicho gen ante diversos estímulos en distintas líneas celulares humanas de origen mamario.

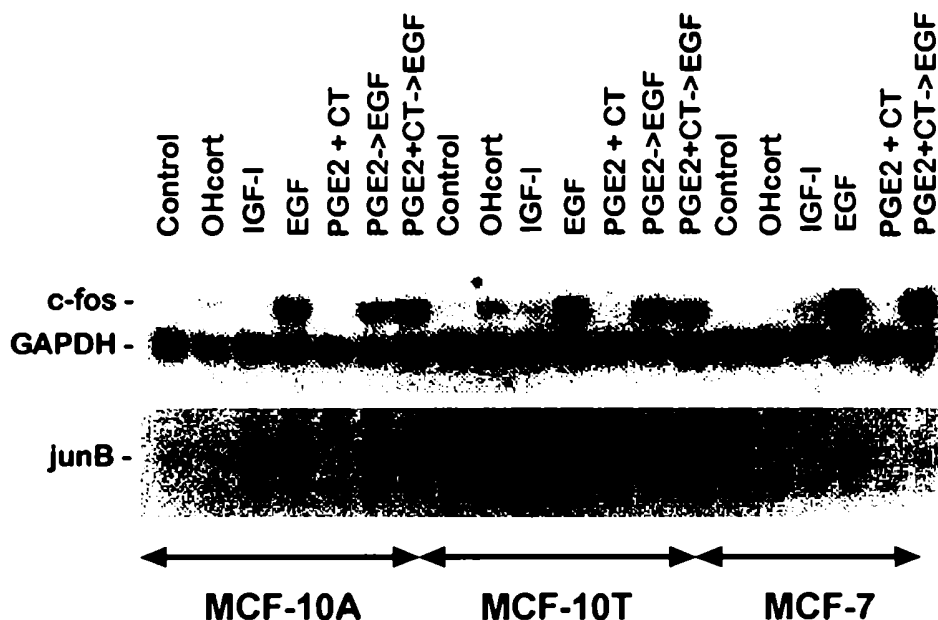
En la Fig. 20 se observa que el EGF y el PMA son inductores generales de los niveles de ARNm de *c-fos* en las todas las líneas celulares estudiadas. Otros agentes, como la insulina, el IGF-1, la adición conjunta de PDGF AA y BB, 4 $\alpha$ OH forbol, DiBuAMPc (un análogo permeable y estable del segundo mensajero AMPc) no producen variaciones significativas en los niveles del *c-fos* en las líneas MCF-10A, MCF-10T, MCF-7 o MDA-453 mientras que la hidrocortisona exhibe un leve efecto estimulador en MCF-10T, aunque muy

inferior al inducido por EGF. En SKBR3, la insulina a dosis suprafisiológicas como el IGF-I incrementan los niveles de ARNm de *c-fos* en forma similar a la producida por el EGF o el PMA. El leve efecto estimulador de la hidrocortisona sobre el *c-fos* se observó nuevamente en diversos experimentos, principalmente en MCF-10T y en menor medida en MCF-10A aunque no en MCF-7 (Fig. 21). No se observó efecto alguno de la hidrocortisona sobre el *junB*. En la misma figura se muestra además que agentes que incrementan el metabolismo del AMPc, como la toxina de cólera o la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) no solo no inducen los proto-oncogenes analizados si no que además no interfieren con la acción del EGF (ver **Determinación de la activación de MAPk y fosforilación en tirosina del receptor de EGF** para un análisis más detallado de la acción del AMPc en estas células). Un efecto similar ocurre con el DiBuAMPc (dato no mostrado).



**Fig. 20.** Efecto de diversos agentes sobre la expresión de *c-fos* en células de mama





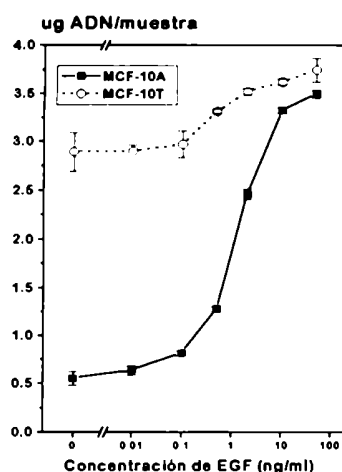
**Fig. 21.** Efecto de diversos agentes sobre la expresión de *c-fos* y *c-jun* en diversas líneas celulares de mama humana

### 8.8. Estudio particular del efecto del EGF

Dado el notable efecto del EGF sobre las líneas celulares en estudio y debido a la relación existente entre la amplificación del receptor de EGF con un pobre pronóstico en cáncer de mama, procedí a analizar con mayor detalle la acción de dicho mitógeno.

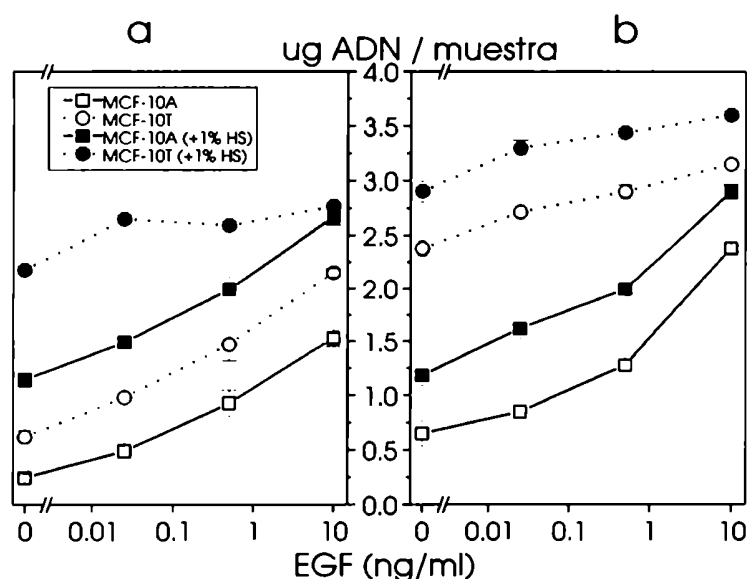
#### 8.8.1. Proliferación

Al crecer las líneas celulares MCF-10A y MCF-10T en medio BSA suplementado con 1% HS, insulina e hidrocortisona en presencia de distintas concentraciones de EGF, se observó una dosis dependencia por este mitógeno en la línea MCF-10A mientras que la línea MCF-10T prolifera independientemente del EGF (Fig. 22).



**Fig. 22.** Proliferación de células MCF-10A y MCF-10T en medio BSA suplementado con HS (1%), insulina (5 ug/ml), hidrocortisona (0.5 ug/ml) y distintas dosis de EGF.

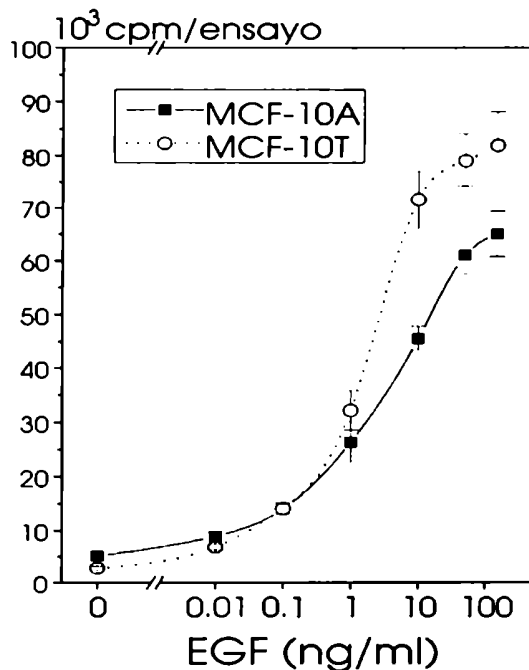
Para estudiar si esta diferencia entre las dos líneas celulares se debía a una falta de reacción de la línea MCF-10T al estímulo del EGF, se repitieron estos ensayos cultivando las células en medio libre de suero (MLS) únicamente, MLS conteniendo 1% HS o MLS suplementado con 0.5 ug/ml de hidrocortisona y 5 ug/ml de insulina. En la Fig. 23 se aprecia que esta aparente independencia a la acción del EGF se debe a una susceptibilidad incrementada por parte de la línea transformada a los factores presentes en el suero equino y/o a la combinación estimuladora de insulina e hidrocortisona ya que ambas líneas, cuando son crecidas en un medio libre de suero (MLS) muestran un patrón similar de proliferación en presencia de distintas dosis de EGF.



**Fig.23.** Proliferación de MCF-10A y MCF-10T - Dependencia del EGF

a) MLS ± 1% HS, b) MLS con 5 ug/ml de ins. y 0.5 ug/ml de HC (± 1% HS)

### 8.8.2. Ensayos de dosis-dependencia del EGF en la inducción de la síntesis de ADN



Para corroborar los efectos observados por acción del EGF sobre la proliferación celular, analicé la capacidad de dicho mitógeno para inducir a las líneas celulares en estudio a entrar en la fase S del ciclo celular. Nuevamente, se demuestra la dependencia de las líneas MCF-10A y MCF-10T respecto del EGF en ausencia de otros estímulos (Fig. 24)

**Fig. 24.** Efecto del EGF en la inducción de la síntesis de ADN

### 8.8.3. Expresión de c-fos -- Dependencia del EGF

Como se observa en la densitometría presentada en la Fig. 25, los niveles de ARNm de c-fos son incrementados en forma dosis dependiente por el EGF en forma similar para las líneas MCF-10A y MCF-10T. Esta dependencia de la concentración de EGF también se aprecia en los niveles de c-jun y c-myc en ambas líneas celulares (Fig. 26). Es necesario destacar aquí que los niveles bajos de expresión de estos proto-oncogenes en las células MCF-10T se debe a las condiciones particulares de la línea celular en este experimento ya que en general, los niveles de expresión basales e inducidos de estos genes son similares para las dos líneas estudiadas.

En ambos casos, las unidades arbitrarias expresan los valores densitométricos del gen en estudio normalizado por el correspondiente valor del gen control, gapdh, para cada experimento.

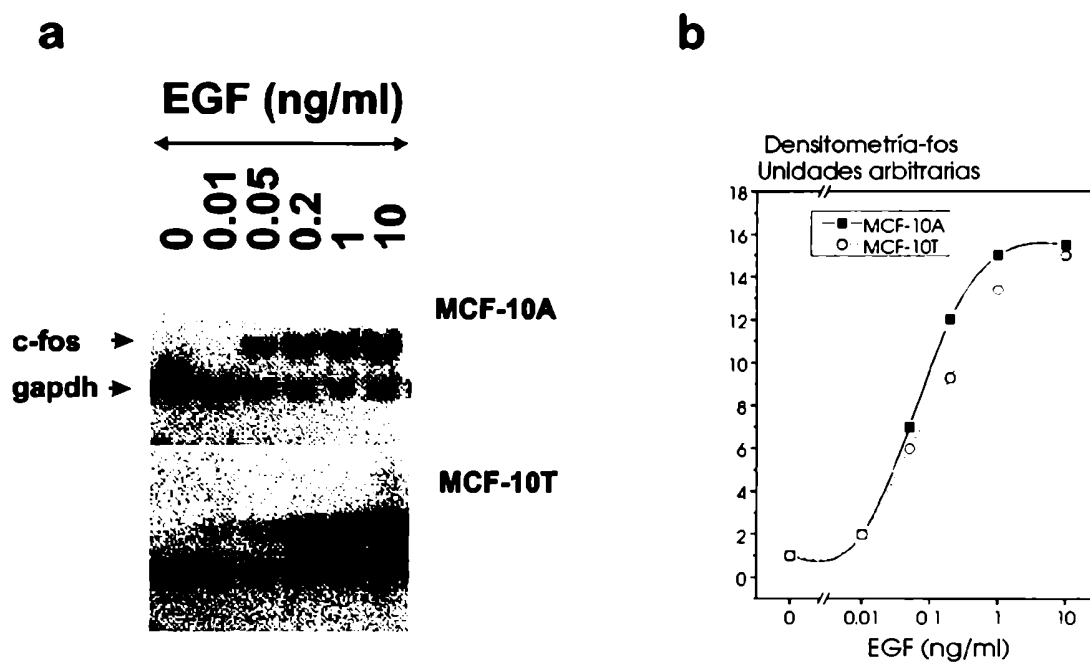


Fig. 25. Efecto del EGF en la inducción de *c-fos* en MCF-10A y MCF-10T

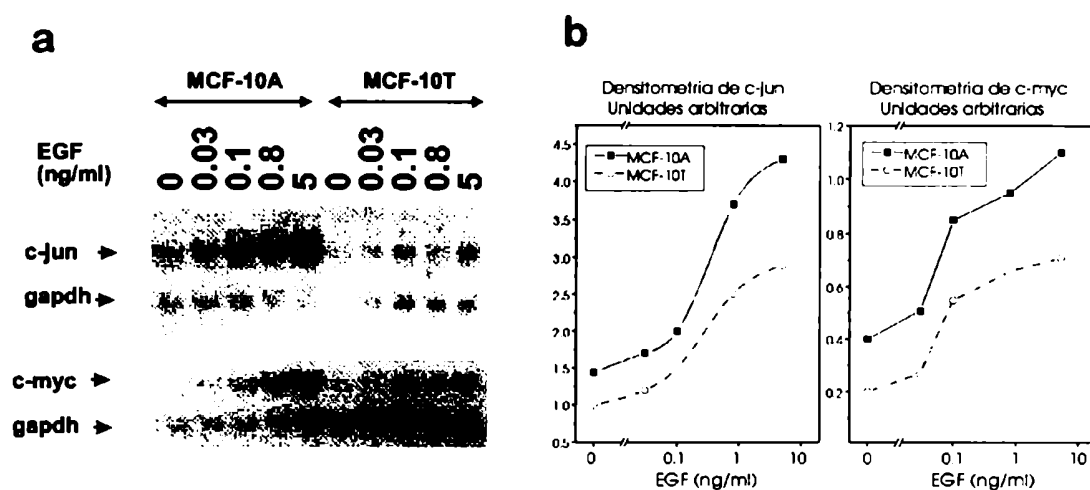


Fig. 26. Efecto del EGF en la expresión de *c-jun* y *c-myc*

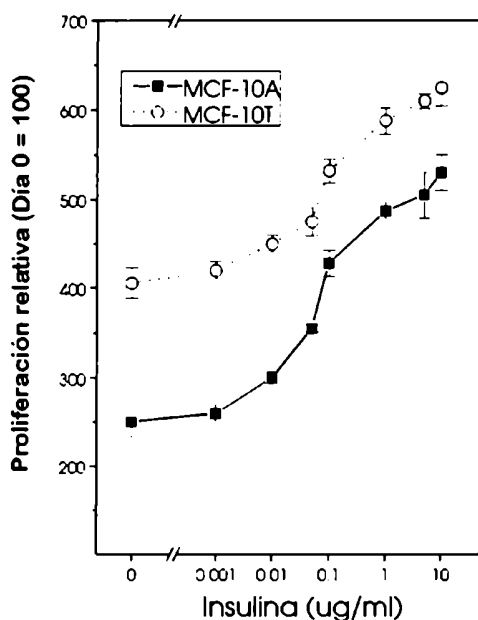
## 8.9. Efecto de diversos agentes sobre la acción del EGF

### 8.9.1. 1) Proliferación

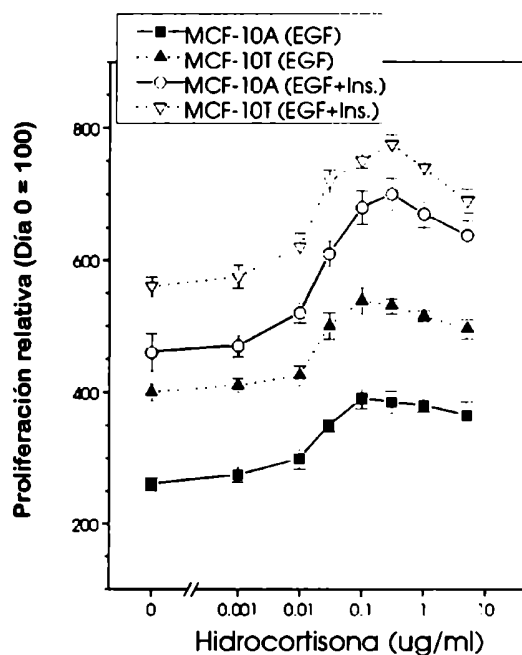
Como fuera descripto anteriormente, el EGF constituye el principal agente mitogénico individual en la proliferación de las líneas MCF-10A y MCF-10T y su efecto puede ser incrementado por la acción de otras hormonas como la insulina o la hidrocortisona.

La Fig. 27 muestra el efecto dosis dependiente de altas concentraciones de insulina sobre la proliferación inducida por EGF en las líneas MCF-10A y MCF-10T.

Por su parte, la hidrocortisona también es capaz de incrementar levemente la proliferación de ambas líneas en presencia de EGF y, en mayor medida, cuando las células son crecidas con EGF e insulina (Fig. 28).



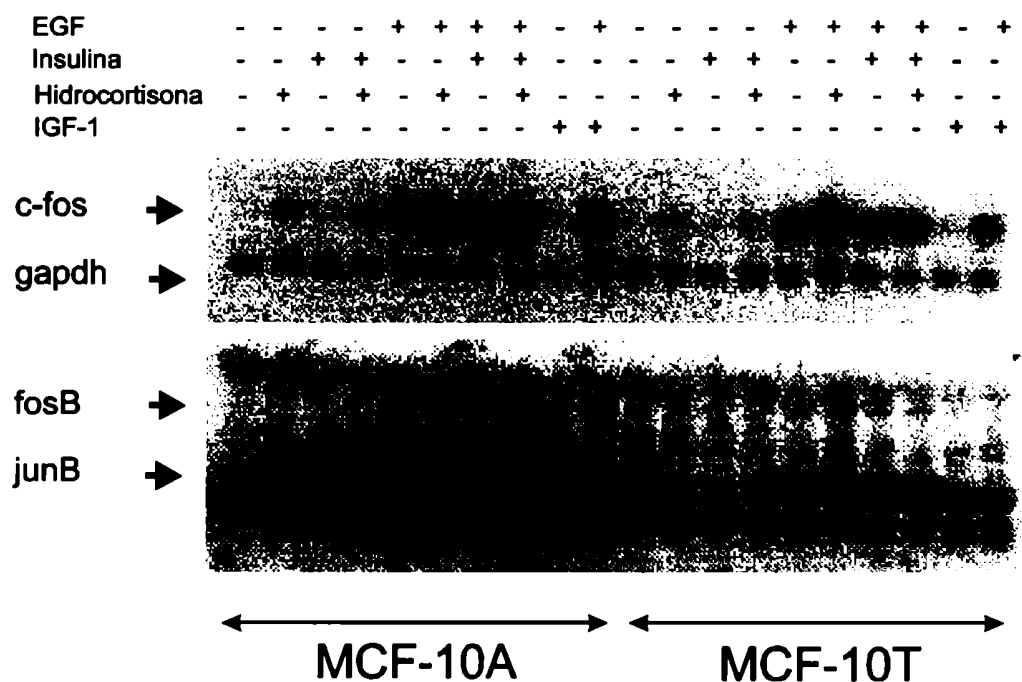
**Fig. 27.** Efecto de la insulina en la proliferación de MCF-10A y MCF-10T



**Fig. 28.** Efecto de la hidrocortisona en la proliferación de MCF-10A y MCF-10T

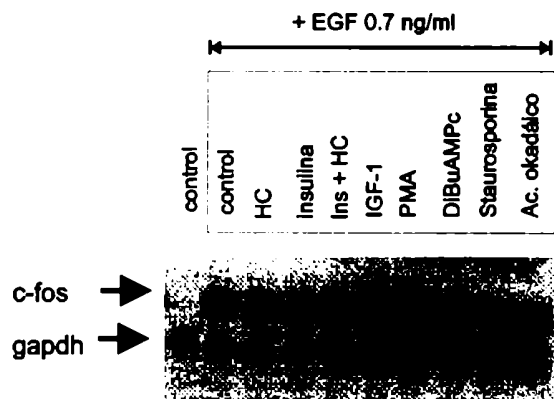
### 8.9.2. Regulación de los niveles de ARNm de proto-oncogenes nucleares

Para estudiar posibles acciones sinérgicas con el EGF se ensayó la estimulación conjunta de EGF con otros agentes. Como se observa en la Fig. 29, a los 45 min de tratamiento con 20 ng/ml de EGF se produce un incremento notable de los niveles de ARNm de *c-fos*, *fosB* y *junB* en las líneas celulares MCF-10A y MCF-10T. Sin embargo, el tratamiento de EGF con 5 ug/ml insulina, 0.5 ug/ml de hidrocortisona o la acción de los 3 agentes juntos, no alteran los niveles de inducción producidos por el EGF. Asimismo, tampoco el IGF-I (50 ng/ml) influye sobre el efecto del EGF.



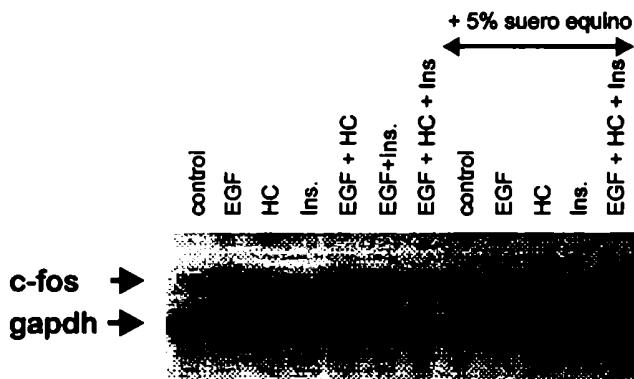
**Fig. 29.** Efecto de diversos agentes en la inducción de proto-oncogenes nucleares mediada por 10 ng/ml de EGF

Para establecer si esto se debía a una saturación del sistema causada por la alta concentración de EGF (usualmente 10 ng/ml), procedí a realizar un experimento similar con niveles menores de EGF (0.7 ng/ml).



**Fig. 30.** Idem Fig. 29 con 0.7 ng/ml de EGF en células MCF-10A

Aún así, no se observaron variaciones en los niveles de ARNm de *c-fos* inducidos por el EGF solo o en forma conjunta con otros reactivos como insulina, hidrocortisona, IGF-I, PMA o DiBuAMPc. El ácido okadáico (50 nM), un inhibidor de la fosfatasa 2A ( $IC_{50}$  0.1 nM in vitro) y la PP1 ( $IC_{50}$  10 nM), no afecta la inducción del *c-fos* por EGF mientras que un inhibidor de kinasas como la staurosporina (200 nM) ejerce un leve efecto inhibitorio (Fig. 30) (ver más adelante **Efecto de inhibidores de kinasas...**).

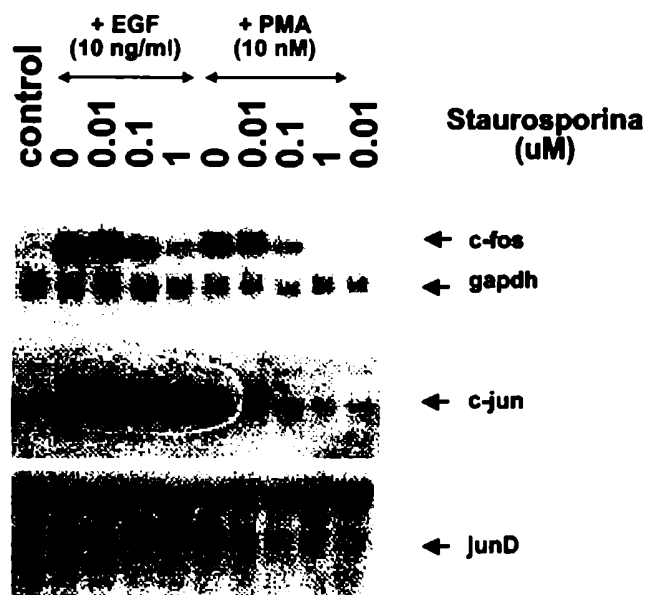


**Fig. 31.** Efecto del HS en la inducción del *c-fos* en MCF-10A

Es de notar además, que el suero equino también produjo la máxima inducción del *c-fos* la cual tampoco fue regulada por la presencia de otros agentes como EGF, insulina o hidrocortisona (Fig. 31).

#### 8.10. Efecto de inhibidores de kinasas en la expresión de proto-oncogenes nucleares

Se encuentra ampliamente descrito en la literatura el papel que desempeñan diversas kinasas en la transducción de señales mitogénicas. Para estudiar estos mecanismos analié la inducción de diversos genes bajo la acción del EGF o el PMA previa incubación de las células MCF-10T durante 20 min con staurosporina, un inhibidor de la PKC.



**Fig. 32.** Efecto de la staurosporina en la inducción de proto-oncogenes nucleares mediada por el EGF y el PMA en células MCF-10A

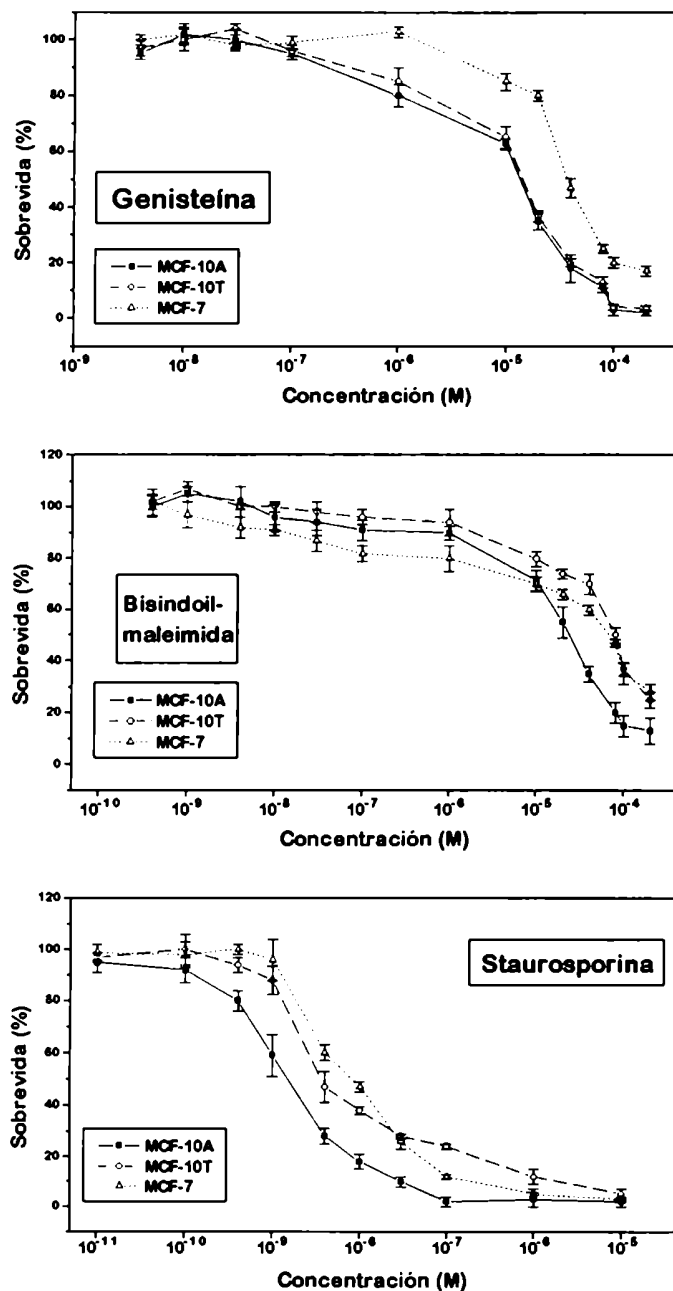
La Fig. 32 demuestra que se requieren dosis mayores a 1 uM de staurosporina para inhibir parcialmente el aumento en el ARNm de *c-fos* inducido por el EGF, mientras que se necesita un orden de magnitud menor para lograr una inhibición similar al tratar las células con PMA. Un efecto

similar ocurre a nivel de los genes *c-jun* y *junD* aunque debido al notorio nivel basal, estos genes parecen ser menos sensibles al tratamiento con staurosporina. En la línea MCF-10A se evidencia un fenómeno similar aunque por lo general la inhibición mayor es observable con dosis de 1 uM (dato no mostrado).

Esto puede deberse en parte a la mayor sensibilidad de esta línea celular a la staurosporina como se deduce de las curvas de inhibición de la Fig. 33. Además, se deduce que las tres líneas celulares estudiadas son inhibidas en su proliferación por dosis bajas de staurosporina (notoriamente menor que la necesaria para inhibir la expresión de proto-oncogenes nucleares) y que la línea MCF-10A ( $IC_{50} 1.6 \pm 0.6$  nM) resulta más sensible a la acción de este agente que MCF-10T ( $IC_{50} 4.5 \pm 0.5$  nM) o MCF-7 ( $IC_{50} 7.1 \pm 1.8$  nM). Este efecto deletereo se observa aún a tiempos cortos, ya que tratamientos de 3-4 hs y posterior remoción del inhibidor, afecta notoriamente la proliferación de estas líneas celulares, en particular, MCF-10A (dato no mostrado). Otro inhibidor específico de PKC, la bisdoil-maleimida, también modificó la proliferación de estas células aunque a dosis mucho mas altas. Nuevamente se aprecia que MCF-10A es levemente mas sensible ( $IC_{50} 18 \pm 7$  uM) que su contraparte transformada por el oncogén *H-ras*, MCF-10T ( $IC_{50} 60 \pm 20$  uM). Por último, un inhibidor de tirosina kinasas, la genisteína, también requiere dosis elevadas para afectar la proliferación, siendo en este caso MCF-7 ligeramente menos sensible ( $IC_{50} 33 \pm 2$



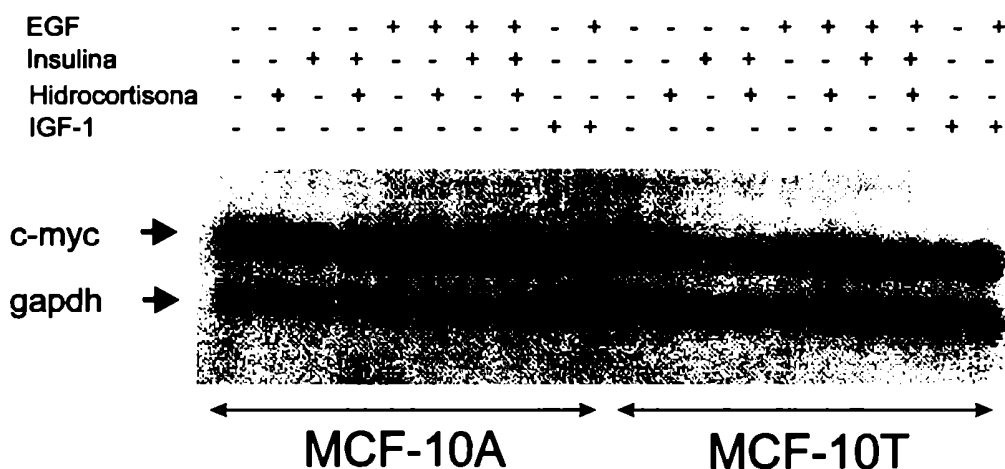
uM) que las líneas MCF-10 ( $IC_{50} 14 \pm 1$  uM), posiblemente debido al menor requerimiento de esta línea tumorigénica por el EGF, cuyo receptor es inhibido por la genisteína.



**Fig. 33.** Efecto de diversos inhibidores de kinasas en la proliferación de líneas celulares de mama

### 8.11. Regulación del gen *c-myc*

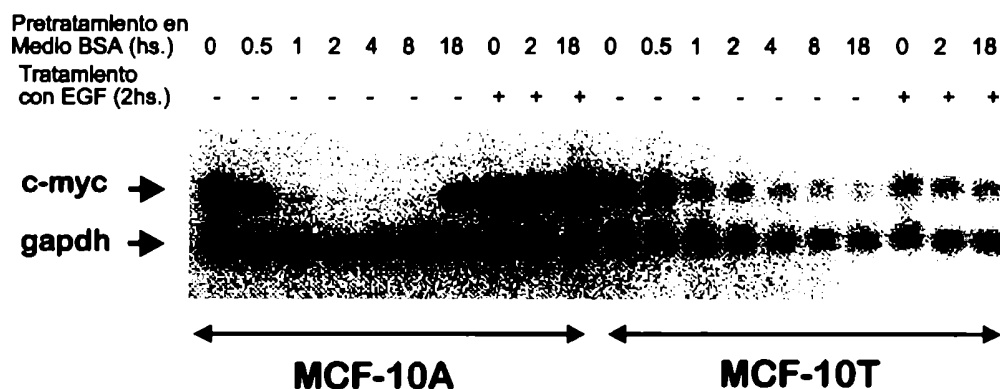
En resultados ya presentados en la Fig. 18, se describió que el proto-oncogén *c-myc* experimenta escasa variación en sus niveles de ARNm frente al estímulo con EGF o PMA. La dificultad para analizar la posible modulación de este gen bajo la acción de diversos agentes, se debe principalmente al alto nivel basal del transcripto que exhiben las células MCF-10A en condiciones de cultivo en medio sin nutrientes (medio-BSA) durante 18 hs (ver Fig. 34). Sin embargo, en estas condiciones, las células mantienen intacta su respuesta a estímulos mitogénicos evidenciada por la capacidad de inducción de otros proto-oncogenes nucleares (*c-fos*, *junB* y *fosB*) como fuera descrito en la Fig. 29 donde se representan ensayos en paralelo con el mismo ARN utilizado en este experimento. Por otra parte, ambas células del linaje MCF-10 en fase proliferativa, expresan niveles basales notorios del gen *c-myc* en comparación con dos líneas tumorigénicas: MDA-453 y MCF-7 (ver Fig. 8 en Caracterización celular y molecular de las líneas MCF-10A y MCF-10T.)



**Fig. 34.** Efecto de diversos agentes en la expresión de *c-myc*

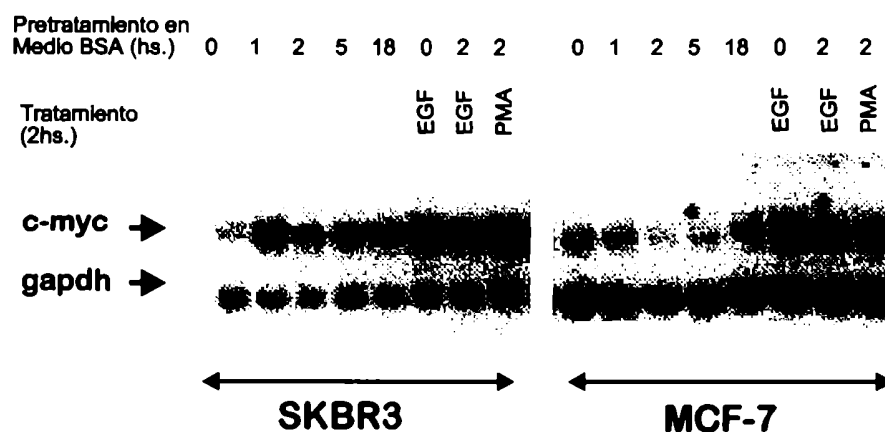
Un resultado interesante se observó al cambiar por 2 hs el medio completo por medio BSA o DME/F12 sin rojo fenol. En estas condiciones, el nivel basal del ARNm de *c-myc* disminuyó notablemente y la relación estimulación/basal producida por distintos agentes se amplificó notoriamente. Un estudio sobre la estabilidad de los transcriptos de *c-myc* en

función del tiempo se representa en la Fig. 35. En ella se demuestra que la expresión de *c-myc* disminuye hasta valores indetectables 2 hs después de sustituir el medio completo por medio BSA. Este efecto perdura al menos durante 8 hs y retorna a los valores originales después de 18 hs de incubación en ausencia de agentes estimuladores. Este efecto regulatorio negativo resulta más notorio en la línea MCF-10A y si bien se observa un fenómeno similar en las células MCF-10T, los niveles de expresión no decrecen tan marcadamente como en las MCF-10A ni se recuperan completamente en igual medida en similar periodo. En ambas líneas celulares, dicho efecto no es evidente si las células se incuban conjuntamente con medio BSA en presencia de un agente estimulador como el EGF (Fig. 35). Además, es necesario destacar que el nivel de estimulación alcanzado por el *c-myc* en ambas líneas celulares es similar para las células crecidas en medio completo o luego de la estimulación con EGF, es decir, resulta independiente del tratamiento previo (Fig. 35).



**Fig. 35.** Efecto de la privación de factores de crecimiento en los niveles de ARNm de *c-myc*

Al estudiar este fenómeno en líneas mamarias neoplásicas (MCF-7 y SKBR3) el nivel basal del oncogén *c-myc* es independiente de las condiciones de cultivo empleadas (Fig. 36). En ambos casos, tanto el EGF como el PMA inducen levemente la expresión de dicho gen.

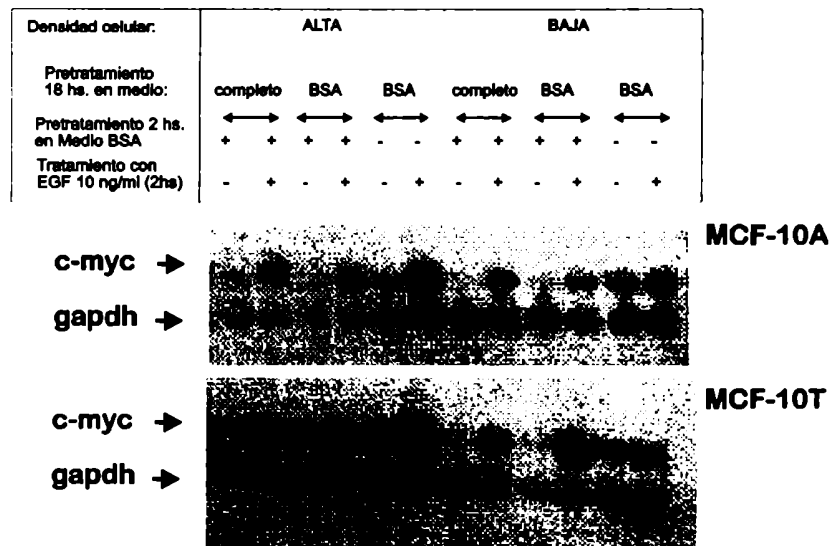


**Fig. 36.** Regulación de los niveles de *c-myc* en células neoplásicas por privación de nutrientes

Para analizar si la diferencia entre los efectos de disminución en los niveles basales del ARNm de *c-myc* entre MCF-10A y MCF-10T es dependiente de la densidad celular, se procedió a analizar los niveles basales del ARNm de dicho gen y su inducibilidad por EGF bajo distintas condiciones de pretratamiento y en dos condiciones de densidad celular: confluencia total (densidad alta) o 50-70% (densidad baja). La Fig. 37 demuestra que en condiciones de alta densidad celular (células quiescentes), tanto MCF-10A como MCF-10T expresan niveles basales bajos cuando se priva las células de nutrientes durante 2 hs. Tampoco se detectaron diferencias en células preincubadas con medio completo o con medio BSA durante toda la noche. Se observa que si no se renueva el medio por 2 hs, las células mantenidas en medio BSA durante 18hs poseen niveles de *c-myc* basales levemente superiores respecto de aquellas células en las cuales el medio fué sustituido. Es de notar que los niveles de inducción del *c-myc* producidos por la estimulación durante 90 min con EGF resultan similares independientemente de las condiciones de pretratamiento.

En condiciones de baja densidad celular, tanto MCF-10A como MCF-10T expresan niveles basales altos de ARNm de *c-myc* cuando las células son preincubadas 18 hs en medio BSA al mismo tiempo que no se observa respuesta al EGF. Al cambiar por 2 hs el medio por medio BSA, los niveles basales disminuyen notablemente al mismo tiempo que reaparece la

estimulación por EGF. Este fenómeno es similar tanto para un pretratamiento de 18 hs en medio completo como en medio BSA.



**Fig. 37.** Efecto de la densidad celular y las condiciones de pretratamiento en la inducción de *c-myc* por EGF

### 8.12. Efecto del TGF $\beta$ 1 en la expresión del gen *c-myc*

El TGF $\beta$ 1, un regulador de la proliferación con amplio espectro de acción, es capaz de inhibir parcialmente la proliferación de diversas líneas celulares de mama como MCF-10A, MCF-10T, MCF-7 y SKBR3 en condiciones de máxima proliferación (Fig. 38).

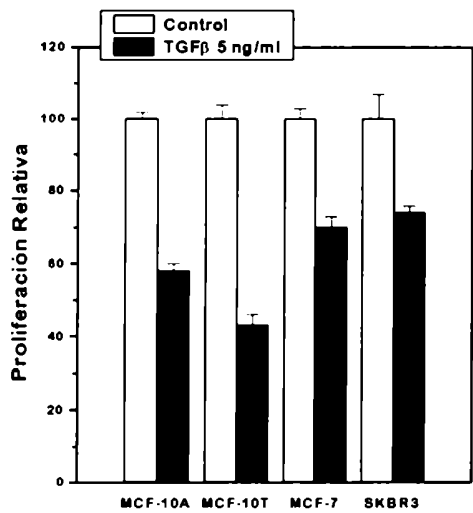


Fig. 38. Efecto del TGFβ1 en la proliferación de células de mama

Al analizar el efecto de este modulador sobre los niveles del RNAm de *c-myc* se observó que la incubación durante 18 hs con 5 ng/ml de TGFβ1 disminuye drásticamente la expresión de este proto-oncogén, tanto en presencia de medio HS como en medio BSA. Este efecto es apreciable en células MCF-10A y en MCF-10T independientemente de la densidad celular (Fig. 39).

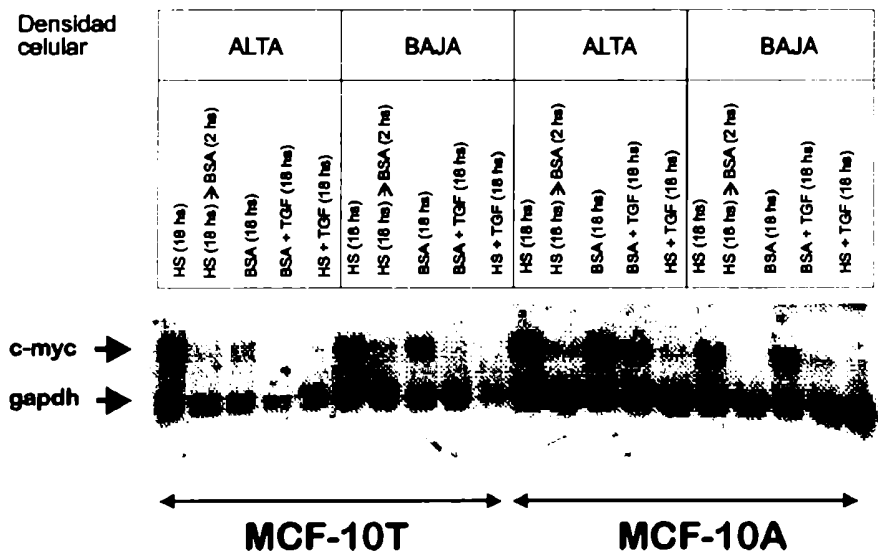
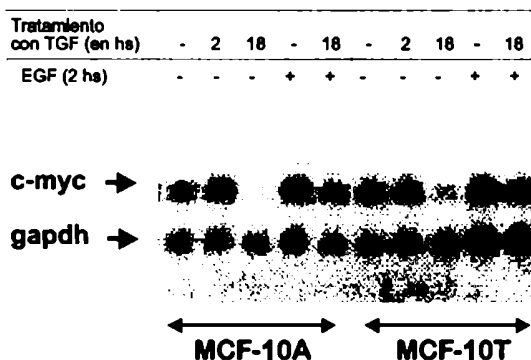
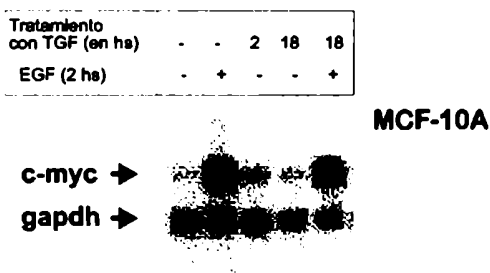
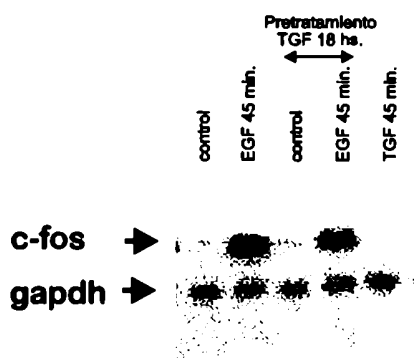


Fig. 39. Efecto del TGFβ1 en la expresión de *c-myc*

**a****Fig. 40.** Cinética del efecto del TGF $\beta$ 1 sobre los niveles de *c-myc***b**

Para que este efecto regulatorio negativo tenga efecto, se requiere una incubación prolongada con TGF $\beta$ 1 ya que tratamientos breves (2 hs) no afectan los niveles de ARNm de *c-myc* (Fig. 40). Por otra parte, solamente se encuentran afectados los mecanismos que regulan la

expresión basal de este proto-oncogén, ya que luego de una incubación de 18 hs con 5 ng/ml TGF $\beta$ 1, las células mantienen aún intacta su capacidad de respuesta al EGF a juzgar por el incremento en la expresión del *c-myc*. Este efecto resulta evidente en cultivos preincubados en medio BSA (Fig. 40a) o en presencia de suero equino y posterior incubación durante 2 hs en medio BSA (Fig. 40b).

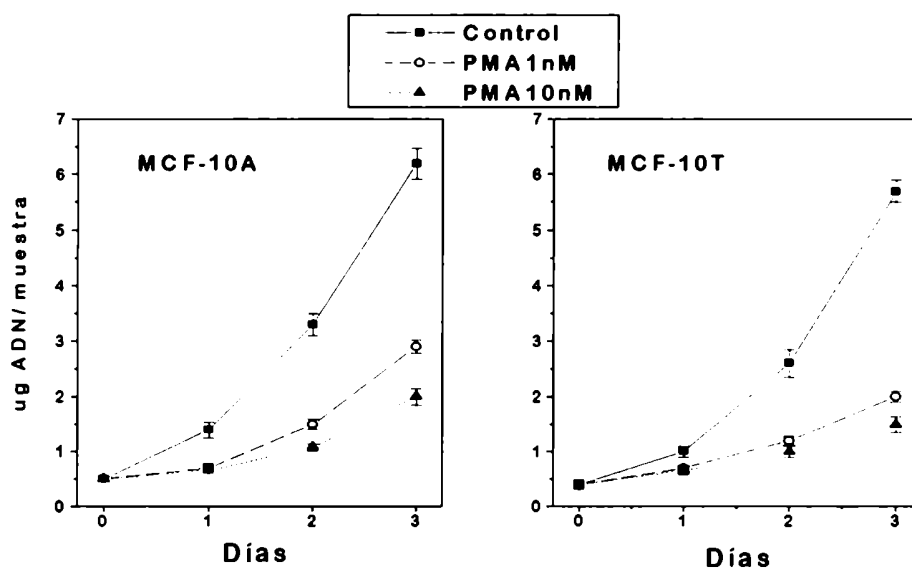


Al analizar el efecto del TGF $\beta$ 1 sobre el proto-oncogén *c-fos*, no se observaron variaciones en los niveles basales ni en la inducibilidad de dicho gen por la acción del EGF (Fig. 41).

**Fig. 41.** Efecto del TGF $\beta$ 1 sobre el *c-fos*

### 8.13. Efecto del PMA sobre la proliferación de líneas celulares de mama

Como fuera descripto anteriormente, el PMA es capaz de inducir diversos proto-oncogenes de las familias fos, jun y myc en forma análoga a la observada para el EGF. En la literatura se encuentra ampliamente descripto el efecto inhibitorio de los ésteres de forbol sobre el crecimiento de diversas líneas celulares de mama como MCF-7 (Darbon *et al.* 1986) y otras. Dado que en nuestro laboratorio se habían estudiado previamente los mecanismos moleculares implicados en dicha inhibición a través de la acción del PMA sobre las ADN Topoisomerasas I y II y su implicancia en la ruptura del ADN (Baldi *et al.* 1993), procedí a analizar la acción de este promotor tumoral sobre la proliferación de las líneas MCF-10A y MCF-10T. En la Fig. 42 se demuestra que el PMA es capaz de inhibir la proliferación de estas líneas en presencia de medio completo en dosis que son capaces de activar la expresión de los proto-oncogenes nucleares.

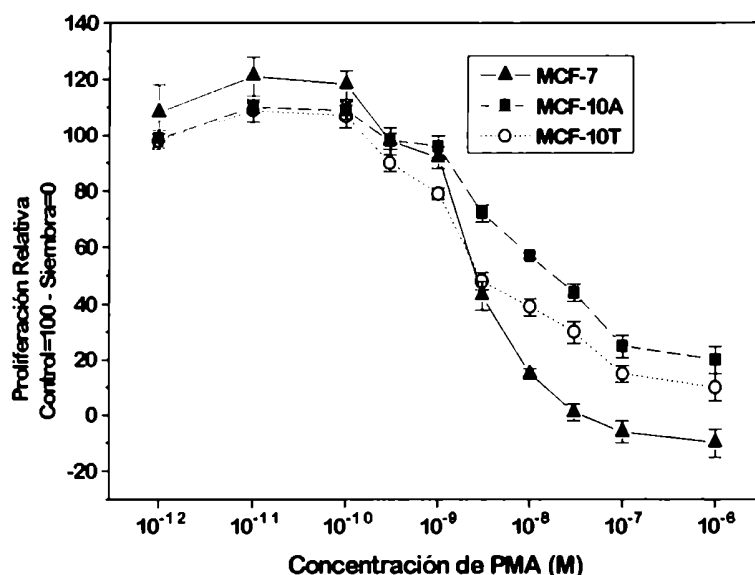


**Fig. 42.** Ecto del PMA en la cinética de proliferación de células MCF-10A y MCF-10T

La Fig. 43 muestra el efecto de distintas dosis de PMA sobre la proliferación de diversas líneas celulares de mama humana estudiadas. Como se aprecia, la acción inhibitoria

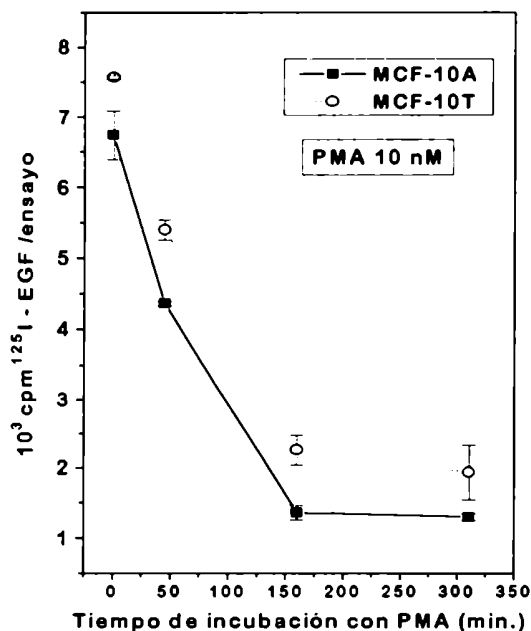


de este promotor tumoral es similar para las 3 líneas celulares con una  $IC_{50}$  de aproximadamente 1-5 nM. Un análogo inactivo del PMA, el 4 $\alpha$ OH forbol, no afecta la proliferación de estas líneas celulares ni es capaz de inducir la expresión de proto-oncogenes nucleares (ver Fig. 17).



**Fig. 43.** Efecto del PMA en la proliferación de células de mama

#### 8.14. Efecto del PMA en la unión de EGF a su receptor

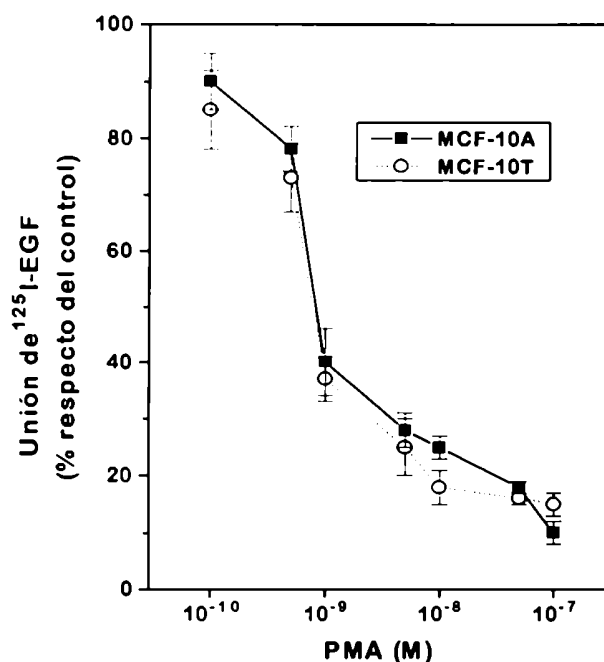


**Fig. 44.** Cinética de inhibición de la unión del EGF a su receptor por el PMA

Debido a que el receptor de EGF ha sido descrito como un sustrato de la PKC, con la consiguiente inhibición en la capacidad de unión del receptor por su ligando, procedí a estudiar si dicho efecto ocurría en las líneas MCF-10A y MCF-10T. La Fig. 44 muestra una cinética de inhibición de la unión de EGF marcado con  $^{125}$ I a distintos tiempos de incubación con PMA 10nM. El PMA inicia su

acción inhibitora mucho antes que se produzca el efecto de la desensibilización del receptor, dado que tratamientos cortos con PMA 10 nM durante 15 min seguidos de un profuso lavado y recuperación de las células por 3 hs en medio BSA, produjo un nivel de inhibición similar al obtenido cuando se incubaba continuamente en presencia de PMA (dato no mostrado).

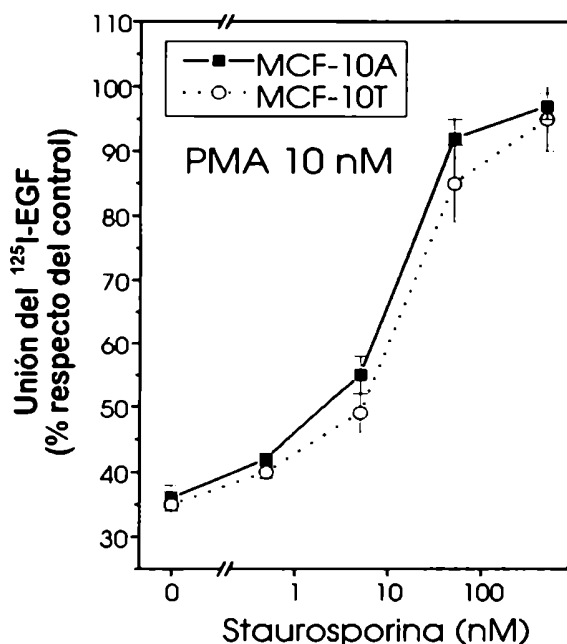
Este efecto inhibitorio es dosis dependiente como se aprecia en la Fig. 45.



**Fig. 45.** Efecto del PMA en la unión del EGF a su receptor

El efecto supresor de la unión del EGF a su receptor se puede revertir preincubando las células 15 min con staurosporina, un inhibidor específico de la PKC, el blanco principal de la acción del PMA (Fig. 46). En este ensayo se incubaron las células durante 30 min con PMA 10nM luego del tratamiento con staurosporina, y este medio fue

reemplazado por medio BSA durante 3 hs previo al agregado de EGF  $^{125}\text{I}$ . Se recurrió a este protocolo debido a la extrema sensibilidad de estas células, en particular MCF-10A, a los efectos tóxicos de la staurosporina, los cuales suelen evidenciarse a las pocas horas de incubación con dosis mayores a 10 nM (ver Fig. 33) del inhibidor. Cabe destacar que la inhibición de la unión del EGF a su receptor mediada por el PMA, también se refleja en una notable disminución de la autofosforilación del receptor inducida por EGF (ver más adelante).



**Fig. 46.** Inhibición de la acción del PMA sobre el receptor de EGF mediada por la staurosporina

### 8.15. Determinación de la activación de MAPk y fosforilación en tirosina del receptor de EGF

En diversos sistemas se ha descrito que la principal vía de acción del EGF para inducir la pléyade de proto-oncogenes nucleares y así ejercer su acción mitogénica es a través de la activación de las ERKs (ver **INTRODUCCIÓN**). Por tal motivo, procedí a analizar la acción de dichas enzimas en presencia del EGF y otros agentes inductores de proto-oncogenes nucleares.

De las diversas técnicas para determinar la activación de ERK, seleccioné aquella basada en cambio de la movilidad electroforética, como consecuencia de la variación en el estado fosforilativo de la proteína, mediante un ensayo de inmunotransferencia. Si bien en forma estricta se valora la habilidad fosforilativa de la MEK en su sustrato específico natural, es ampliamente aceptado en la literatura la equivalencia entre fosforilación de ERK y su activación (Hordijk *et al.* 1994). En la Fig. 47 se muestran los niveles basales de ERK1 y ERK2 en diversas líneas celulares de mama. Así, las células del linaje MCF-10 expresan principalmente p42<sup>ERK-2</sup> mientras que las líneas provenientes de tumores mamarios (MCF-7, SKBR3 y MDA-453) sobreexpresan fundamentalmente p44<sup>ERK-1</sup>. Por su parte, la línea no tumorigénica HBL-100, exhibe niveles similares de ambas proteínas.

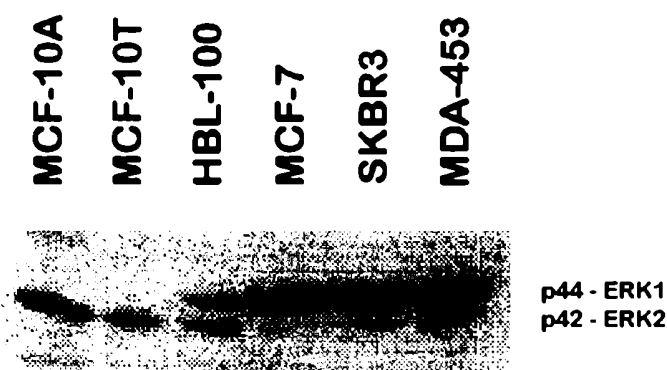


Fig. 47. Niveles de MAPK en líneas celulares de mama humana

Tanto en MCF-10A como en MCF-10T, el agregado de EGF induce la autofosforilación en residuos tirosina del receptor para dicho ligando con una cinética muy rápida, ya que a tiempos tan breves como 2.5 min se observa un alto nivel de residuos P-Tir en el rEGF, los cuales se mantienen elevados sobre el basal aún 40 min luego de la estimulación (Fig. 48a). En la misma figura se observa que  $p42^{ERK-2}$  sigue una cinética de activación similar a la fosforilación del receptor de EGF aunque la desfosforilación de dicha kinasa se completa antes de los 40 min post-inducción. La Fig. 48b es una representación gráfica de la densitometría descrita en la Fig. 48a.

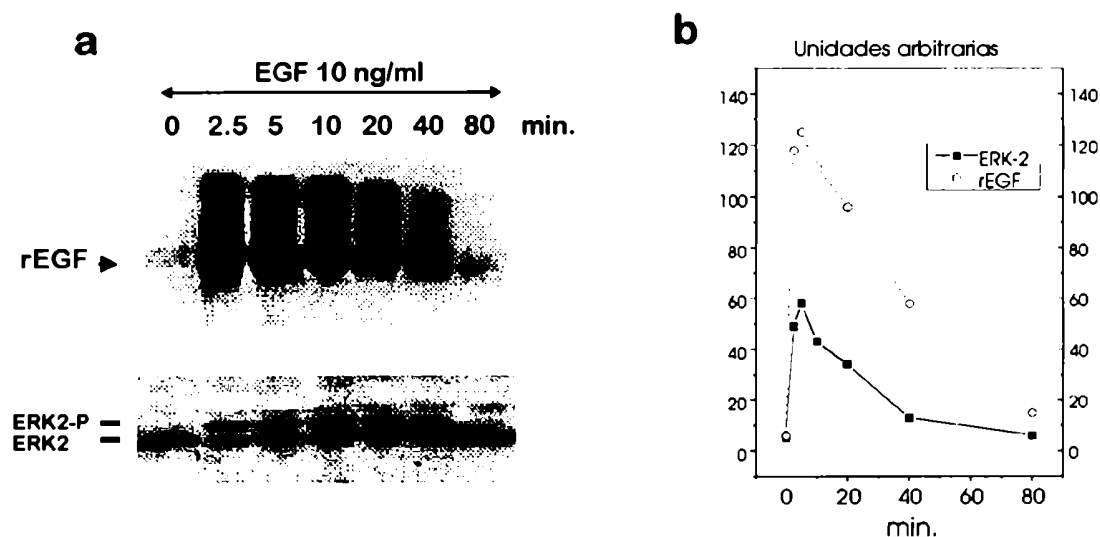
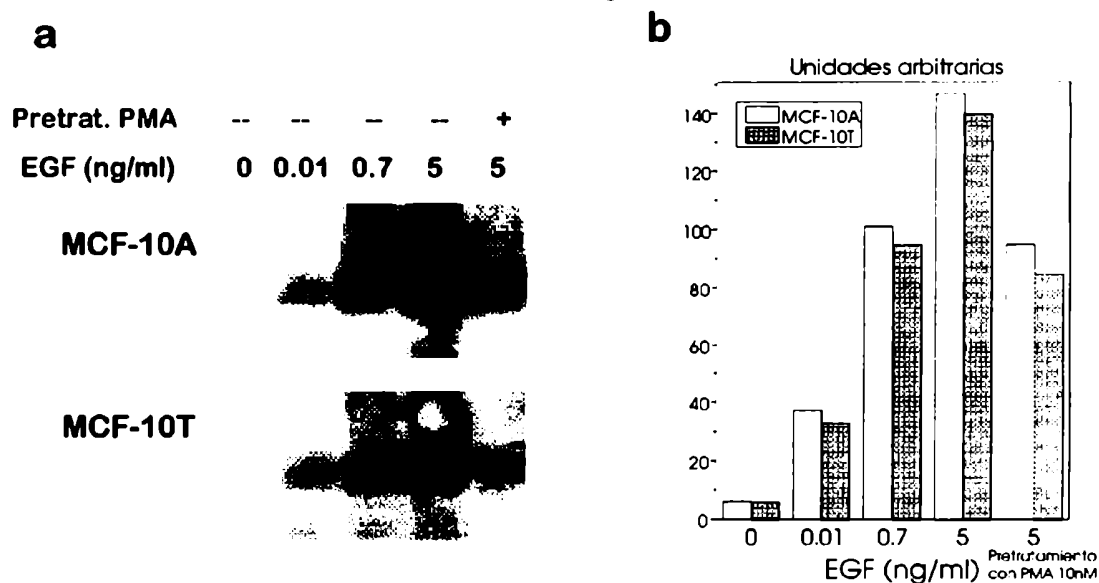
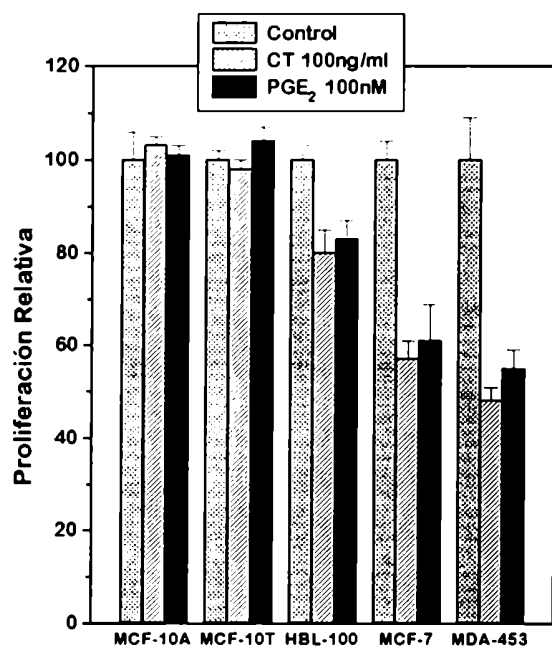


Fig. 48. Cinética de la activación de MAPK y rEGF por el EGF

La autofosforilación del receptor de EGF por acción de su ligando es dosis dependiente y parcialmente inhibida por 2 hs de pretratamiento con PMA 10 nM. (Fig. 49a). La Fig. 49b muestra la densitometría de dicha figura.



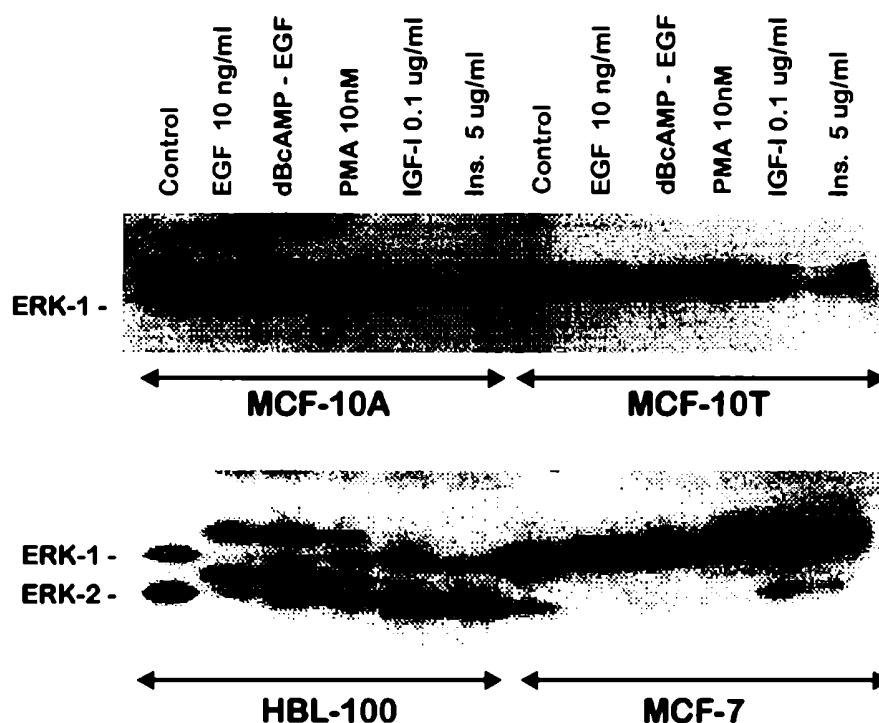
**Fig. 49.** Efecto de la dosis de EGF en la autofosforilación de su receptor



**Fig. 50.** Efecto de agentes inductores de AMPc en la proliferación de líneas celulares de mama humana

Se encuentra ampliamente descrito en la literatura el efecto regulador negativo de la proteína kinasa-AMPc dependiente (PKA) sobre la activación de MAPk. Dicho mecanismo fue descrito en células donde el incremento del AMPc resulta inhibitorio de la proliferación. En las líneas celulares MCF-10A y MCF-10T, inductores de la formación del cAMP como la toxina colérica o la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)

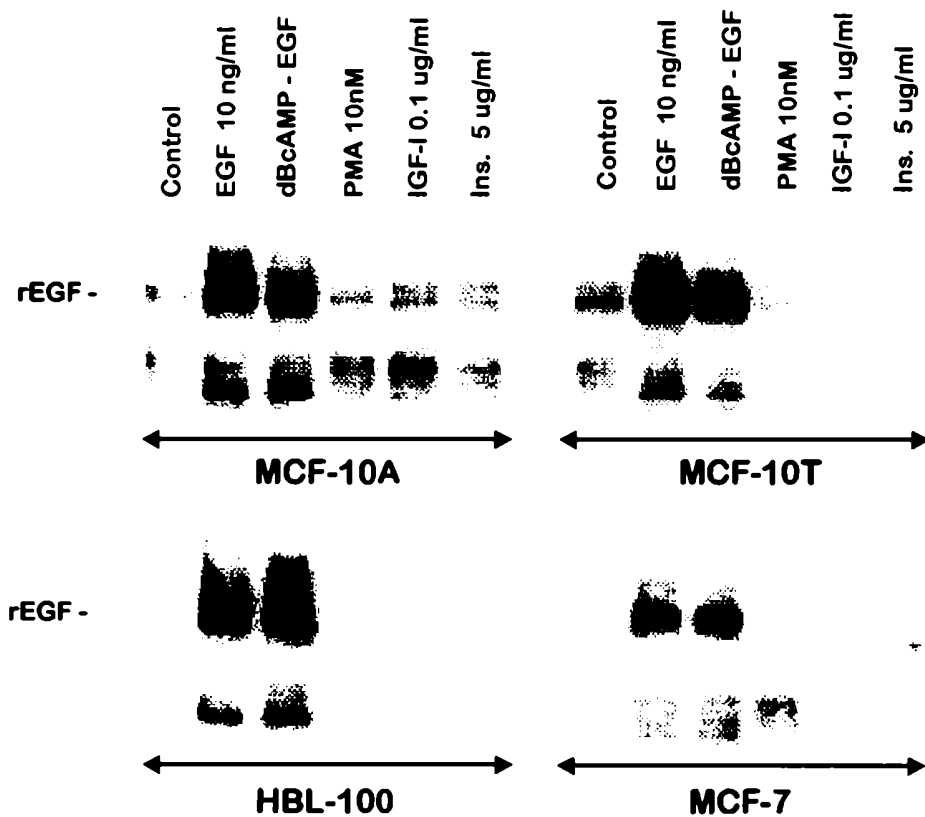
(trabajo en colaboración con el Dr Carlos Davio (FFyB, UBA)) no son capaces de alterar su proliferación en condiciones de medio completo, sin embargo, disminuyen el crecimiento de las líneas HBL-100, MCF-7 y MDA-453 (Fig. 50). Al analizar la influencia de los niveles de AMPc en la activación de las MAPk por EGF se observó que en las líneas celulares estudiadas (MCF-10A, MCF-10T, HBL-100 y MCF-7), la preincubación durante 10 min con diBuAMPc no afecta la activación inducida por dicho mitógeno (Fig. 51).



**Fig. 51.** Efecto de diversos agentes en la activación de MAPk

Tampoco se evidenció inhibición por pretratamientos con DiBuAMPc entre 5 y 60 min ni por preincubación con PGE<sub>2</sub> y toxina de cólera (datos no mostrados). Cabe destacar que en MCF-10A, MCF-10T o en MCF-7, los agentes inductores de AMPc alteraron la inducción de proto-oncogenes nucleares por acción del EGF (ver Fig. 21 en Análisis de la expresión del proto-oncogén *c-fos* bajo la acción de diversos agentes.)

Por último, el PMA también indujo, en forma similar al EGF, la activación de las MAPk en las líneas MCF-10A, MCF-10T, HBL-100 y MCF-7 (Fig. 51) mientras que ni el IGF-I (100 ng/ml) ni la insulina (5ug/ml), cambiaron el estado fosforilativo de las ERKs. En estos análisis se comprobó además que el DiBuAMPc no alteró la autofosforilación del receptor de EGF inducida por dicho ligando. La Fig. 52 muestra la acción de dichos agentes en la autofosforilación del rEGF.



**Fig. 52.** Efecto de diversos agentes en la fosforilación en residuos tirosina del receptor de EGF

## 9. DISCUSION

El objetivo de la presente Tesis consistió en estudiar diversos parámetros involucrados en la proliferación de células mamarias humanas bajo la acción de hormonas peptídicas y de agentes que actúan como promotores tumorales. Las principales variables estudiadas comprendieron: capacidad proliferativa, síntesis de ADN y mecanismos moleculares que controlan la cascada de señales que promueven la división celular. De la amplia gama de señales moleculares se analizaron especialmente las relacionadas con la expresión de proto-oncogenes que codifican para proteínas de localización nuclear (proto-oncogenes nucleares). Dichas proteínas ejercen su acción regulando la transcripción de genes involucrados en la división celular. Asimismo, se estudió la activación de ciertas kinasas que participan en la vía de señales que regulan la expresión de dichos proto-oncogenes.

Estos estudios se realizaron utilizando como modelo de trabajo diversas líneas celulares. El arquetipo principal lo constituyó la línea no tumorigénica MCF-10A, establecida a partir de tejido mamario humano normal y su contraparte transformada con el oncogén *H-ras*, MCF-10T. También se emplearon diversas líneas de mama humana ampliamente descritas en la literatura, tanto no tumorigénicas (HBL-100) como neoplásicas (MCF-7, SKBR3 y MDA-453) como modelos comparativos de los parámetros analizados.

### 9.1. Caracterización de las líneas celulares MCF-10A y MCF-10T

La línea MCF-10A fue caracterizada en la Michigan Cancer Foundation en 1990 por el grupo del Dr. José Russo (Soule *et al.* 1990). Como fuera descrito anteriormente, es el único modelo descrito hasta el presente de línea celular inmortalizada no tumorigénica de mama humana con mínimas alteraciones cromosómicas. La línea MCF-10T es una variante no clonal de la anterior obtenida por transfección con el oncogén *H-ras*, el cual le confiere un fenotipo transformado (Basolo *et al.* 1991). Ambas líneas fueron establecidas recientemente, lo cual implica que su caracterización es incompleta.



Por tal motivo, procedí a analizar diversos parámetros estructurales y moleculares a fin de contribuir con su caracterización.

### **9.1.1. Caracterización morfológica**

**MCF-10A:** Estudios por microscopía óptica de fase de la línea MCF-10A reveló una estructura plana regular escamoide no estratificada que coincide con la descrita por J. Russo *et al.* (Russo *et al.* 1991). Esta descripción es válida tanto para células a baja densidad como confluentes. La estructura plana ligeramente poliédrica en confluencia, con una gran adherencia al sustrato de cultivo, es reminiscente de diversas líneas celulares no tumorigénicas y contrasta la de células tumorales. Estas últimas, debido a la menor adherencia y la mayor secreción de proteasas específicas, adquieren una conformación más redondeada e irregular, como se aprecia en células MCF-7.

Conforme las células MCF-10A proliferan, éstas cubren enteramente la placa de cultivo (100% de confluencia) conservando su capacidad para iniciar un nuevo ciclo mitótico en presencia de nutrientes y factores de crecimiento hasta alcanzar densidades celulares de 80.000-120.000 células/cm<sup>2</sup>. Durante este período muestran solo leves cambios en la morfología, conservando siempre su disposición en monocapa. En este estado, las células no son capaces de continuar su proliferación aún en presencia de factores de crecimiento pero son viables si se las tripsinza y replaquean a menor densidad celular, de ello se deduce que sufren inhibición por contacto, propio de líneas inmortalizadas no tumorales. En caso de prolongarse el cultivo en condiciones de elevada densidad celular por más de 24 hs sin renovación de nutrientes, se producen daños irreversibles que conducen a la muerte de la población celular.

**MCF-10T:** a densidades bajas, las células presentan una morfología plana notoriamente más irregular que las MCF-10A. Con el incremento de la densidad celular, se observa la coexistencia de zonas bien definidas con conformaciones netamente diferentes. Si bien la mayoría de las células adquieren una estructura poliédrica más regular (similar a las MCF-10A) al llegar al 100% de confluencia, también se observan regiones con cúmulos de células fusiformes. Es necesario destacar que estas estructuras con células alargadas van

disminuyendo conforme se prolonga el cultivo. Esta morfología difiere de la descrita por Russo et al (Russo *et al.* 1991) quienes describieron originalmente a la línea MCF-10T como cuboide estratificada con dos conformaciones en confluencia netamente diferenciadas: una monocapa continua con células regulares poliédricas denominada zona A y formación de colonias sólidas con patrones de proliferación desorganizados, pérdida de inhibición por contacto y células pleomórficas más redondeadas o zona B. Sin embargo, estos cúmulos celulares de la zona B también tendían a desaparecer con el tiempo en cultivo. Con el mantenimiento de esta línea, y debido a su origen no clonal, es probable que se hallan segregado dichas poblaciones en favor de otros clones menos transformados pero más proliferativos.

Respecto de su proliferación a alta densidad celular, al igual que MCF-10A, estas células pueden dividirse aún en confluencia con modificaciones en su estructura celular. Sin embargo, una vez alcanzada la máxima densidad (aprox. 120.000 células/cm<sup>2</sup>), no pueden reiniciar un nuevo ciclo celular, lo cual, junto al crecimiento preferencial en monocapa (no se apreció formación de focos de transformación), indicaría que MCF-10T también sufre inhibición por contacto en su proliferación. A diferencia de las MCF-10A, éstas células pueden mantenerse a estas densidades celulares máximas durante 48-72 hs sin cambio de medio antes de que se inicie la muerte celular.

Si bien las células MCF-10T difieren levemente de las MCF-10A cuando llegan a confluencia, su morfología, el crecimiento exclusivo en monocapa y la gran adherencia al sustrato de cultivo (ambas requieren tratamientos prolongados con tripsina para replicarlas) contrasta con diversas características de líneas tumorigénicas como MCF-7, SKBR3 o MDA-453, las cuales resultan más refringentes por su estructura redondeada, pueden disociarse del sustrato de anclaje sin necesidad de tripsinización y forman colonias estratificadas cuando proliferan a alta densidad.

### **9.1.2. Caracterización molecular**

Dado que la línea celular MCF-10T exhibía características morfológicas y proliferativas similares a las MCF-10A pero distinta a las líneas tumorales, se diseñaron diversos experimentos para corroborar la identidad de esta línea celular.

MCF-10T es una línea establecida por co-transfección estable con el oncogén activado T24 *H-ras* y el gen de resistencia a neomicina (aminoglicósido 3' fosfotransferasa). En tal sentido, la capacidad de proliferar aún en presencia de 400 ug/ml de G418, un análogo de neomicina, demuestra la presencia del gen Neo<sup>R</sup>. Dosis menores de dicho agente resultan tóxicas para MCF-10A que posee un genotipo Neo<sup>r</sup>. Por otra parte, los estudios de amplificación por PCR y posterior análisis con una enzima de restricción específica (MspI) para la zona que comprende el codón 12 del gen *H-ras* normal evidencian que MCF-10T posee, además de su gen natural *H-ras* normal (heredado de MCF-10A), un transgén *H-ras* mutado en el codón 12. Estos datos, junto con la sobreexpresión del ARNm de *H-ras* en éstas células, establecen la identidad de la línea celular MCF-10T utilizada durante los experimentos de esta Tesis, como el producto de transformación de la línea MCF-10A con el oncogén *H-ras*.

### **9.1.3. Proliferación libre de anclaje**

Si bien MCF-10T fue originalmente descrita como línea tumorigénica por su capacidad de crecer en sustratos semisólidos y formar tumores en ratones atímicos, al analizar la proliferación en agar semiblando, los cultivos de MCF-10T forman colonias con una eficiencia muy baja (<5%) a diferencia de células con fenotipo completamente neoplásico, como las MCF-7, las cuales exhiben una proliferación independiente de anclaje siempre mayor al 50%. MCF-10A, en cambio, son incapaces de proliferar en medio semisólido.

En este sentido, es necesario destacar un trabajo reciente en el cual MCF-10T (mencionadas como MCF-10A *ras*) son descritas como no tumorigénicas en ratones atímicos y poseen una eficiencia de proliferación independiente de anclaje de 2-3% en medio conteniendo 5% HS y EGF (Normanno *et al.* 1994). Estos resultados sugerirían nuevamente

que la línea original MCF-10T contenía poblaciones más tumorigénicas que fueron segregándose con el tiempo a favor de clones más proliferativos.

### **9.2. Análisis de proteínas codificadas por genes supresores tumorales**

El estudio de los niveles proteicos de dos proteínas de reconocida acción en el control de la proliferación de células eucariotas, p53 y pRb evidenció que no existen variaciones significativas de estas proteínas entre las líneas MCF-10A y MCF-10T. De igual modo, no se evidenciaron diferencias entre éstas y otras líneas provenientes de tejido tumoral como MCF-7, SKBR3 y MDA-453. Solo la línea no tumorigénica HBL-100 contiene niveles ligeramente menores de pRb respecto de las otras líneas estudiadas. El análisis por inmunotransferencia realizado no permite apreciar mutaciones o pequeñas deleciones en esta proteína.

Por otra parte, HBL-100 es la única que expresa niveles elevados de p53 de acuerdo al análisis utilizando el anticuerpo monoclonal pAb421 (Harlow *et al.* 1981), reactivo contra una porción carboxi terminal normal conservada en p53. Además, el uso del anticuerpo monoclonal pAb240, que detecta diversas formas mutadas de p53 y no la proteína normal (Gannon *et al.* 1990), indica que HBL-100 sobreexpresa en efecto una versión alterada de dicho gen supresor. Nuevamente, la metodología implementada no permite identificar otro tipo de mutaciones distintas a las detectadas por pAb240. Por lo general, las alteraciones que afectan la función supresora de p53 suelen generar la sobreexpresión de dicha proteína por mecanismos de retroalimentación.

### **9.3. Estudio de la proliferación de diversas líneas celulares de mama humana**

Al analizar la capacidad proliferativa de las líneas celulares utilizadas en esta Tesis, se comprobó que las líneas provenientes de tejido mamario normal exhibieron un nivel de duplicación notablemente mayor que las de origen neoplásico cuando se las cultivaron en un

medio rico de nutriente (el correspondiente "medio completo" para cada una de ellas). Así, tanto MCF-10A como su contraparte transformada con *H-ras*, poseen un tiempo de duplicación aproximado de 24-30 hs, sensiblemente menor que el observado para las tres líneas tumorales estudiadas: MCF-7, SKBR3 y MDA-453, las cuales requieren aproximadamente 60-80 hs para completar su ciclo mitótico. HBL-100, por su parte, exhibe un tiempo de duplicación intermedio entre ambos grupos. Si bien el medio completo de mantenimiento de las líneas MCF-10 es más rico en factores de crecimiento que los utilizados en las otras líneas celulares (especialmente por los altos niveles de EGF e insulina), el agregado de estos factores al medio conteniendo 10% de FCS no afectó notablemente la proliferación de estas líneas celulares (dato no mostrado).

Por el contrario, la línea MCF-10A, de características no tumorigénicas, no es capaz de proliferar y, por ende, sufre necrosis celular, en un medio de crecimiento rico en vitaminas y aminoácidos pero carente de factores de crecimiento exógeno (medio libre de suero (MLS) conteniendo 1 mg/ml de BSA y 0.1% de FCS). Como fuera descripto en la caracterización de estas líneas celulares, MCF-10T es más resistente que MCF-10A a la falta de mitógenos externos y por lo tanto capaz de sobrevivir, aunque con una mínima capacidad proliferativa en este medio. Este fenómeno se observa a alta como a baja densidad celular. Ha sido descripto que la línea MCF-10A produce niveles bajos de  $TGF\alpha$ , un agente mitogénico que reconoce al receptor del EGF para su acción aunque es capaz de ejercer otras acciones uniéndose a dominios diferentes en la porción extracitoplasmática de dicho receptor (Winkler *et al.* 1993). Estos niveles serían insuficientes para mantener el crecimiento autócrino de estas células. Sin embargo, MCF-10T secreta esta hormona en concentraciones 4-6 veces superiores permitiendo una retroalimentación autócrina en esta línea celular como fuera descripto por Ciardiello *et al.* (Ciardiello *et al.* 1990). Por otra parte, trabajos recientes indican que tanto las células MCF-10A transformadas por un oncogén activo *H-ras* como por la sobreexpresión de *c-neu* exhiben niveles elevados, respecto de su contraparte normal, de ARNm codificante de anfiregulina. Esta proteína pertenece a la familia del EGF y resulta tan potente como el EGF en estimular la proliferación dependiente de anclaje en MCF-10A. También favorece al crecimiento de colonias en agar semisólido de MCF-10A *ras* y MCF-

10A *neu*. Por otra parte, la expresión de anfiregulina es dependiente del EGF en la línea normal como sus variantes transformadas (Normanno *et al.* 1994).

Todas las líneas tumorigénicas estudiadas fueron capaces de proliferar en MLS/BSA, aunque a un ritmo menor que el evidenciado en un medio conteniendo 10% de FCS, pudiendo duplicar su población luego de 6-7 días en cultivo. Nuevamente, HBL-100 mostró un comportamiento intermedio entre ambos tipos celulares. En ciertas líneas tumorigénicas de mama, como MCF-7, se se ha descripto que sobreexpresan niveles elevados de TGF $\alpha$ , los cuales contribuirían notablemente en la proliferación de estas células en medios carentes de mitógenos externos (Lippman *et al.* 1986).

Teniendo en cuenta la notable dependencia de agentes mitogénicos externos de las líneas celulares MCF-10A y MCF-10T (en particular de la primera) para la proliferación sustrato-dependiente, analicé el efecto individual de los componentes del medio en el cual se cultivan normalmente estas células.

Se corroboró que en presencia del medio base (DME/F12) suplementado con 1 mg/ml de BSA y 1 % de suero equino, MCF-10T exhibía una capacidad proliferativa mayor que MCF-10A y solo resultaba sensible a la presencia de EGF mientras que la hidrocortisona y la insulina a dosis suprafisiológicas poseían muy leves efectos estimulatorios. MCF-10A, por el contrario, respondió notablemente al EGF e insulina duplicando la capacidad proliferativa de las células cultivadas solo en presencia de suero equino.

Cuando estos ensayos de proliferación se realizaron en un medio definido rico en nutrientes, formulado para mantener el cultivo celular en ausencia de suero (medio libre de suero o MLS), ambas líneas resultaron dependientes de la presencia de mitógenos como EGF o insulina para su proliferación mientras que la hidrocortisona *per se* no afectó su crecimiento. También se demostró que un agente que aumenta el metabolismo de AMPc, como la toxina de cólera, tampoco induce proliferación en estas células en presencia o ausencia de suero equino. En diversos trabajos relacionados con el mantenimiento de líneas normales de mama, se sugiere que la hidrocortisona como la toxina de actúan bloqueando la

diferenciación de las células mamarias conservando el estadio desdiferenciado proliferativo (Basolo *et al.* 1992).

Es necesario destacar que la insulina, aún a dosis suprafisiológicas (5 ug/ml) solo es capaz de inducir el proceso mitótico en estas líneas celulares en un 50-70% del efecto producido por el EGF a dosis 1000 veces menor (5-10 ng/ml).

La importante acción mitogénica del EGF sobre las líneas estudiadas lo convierte en el más sobresaliente, pero no el único, factor que posibilita la proliferación celular. Del análisis sobre las posibles interacciones entre los distintos agentes estudiados, se corroboró que tanto la insulina como la hidrocortisona colaboran con el EGF en la estimulación del crecimiento celular, posiblemente por vías distintas. En particular, la combinación de los tres agentes produce el máximo estímulo proliferativo (en ausencia de suero equino) que se aproxima a la rápida respuesta de estas líneas en medio completo. La presencia o ausencia de toxina de cólera no modificó sustancialmente la capacidad proliferativa de estas células cultivadas con los otros agentes mitogénicos descriptos.

Ensayos realizados para estudiar la inducción de la síntesis de ADN (estimulación  $G_0 \Rightarrow S$ ), arrojaron resultados similares. Como componentes individuales, EGF e insulina fueron capaces de estimular la entrada a fase S de MCF-10A y MCF-10T mientras que la hidrocortisona no resultó mitogénica e, incluso, mostró un leve efecto inhibitorio. Sin embargo, al analizar el efecto conjunto de estas drogas, solo la combinación triple de las mismas produjo un notable sinergismo en la estimulación de la síntesis de ADN mientras que ni la insulina ni la hidrocortisona individualmente mejoraron la acción del EGF (en algunos casos la hidrocortisona resultó inhibitoria). Esto implicaría que ambos compuestos podrían ejercer parcialmente su acción a través de mecanismos posteriores a los que regulan la inducción  $G_0 \Rightarrow S$  como el procesamiento metabólico de nutrientes o por alteración del tiempo de duración de la fase  $G_1$ .

#### 9.4. Expresión de proto-oncogenes nucleares en MCF-10A y MCF-10T

El estudio de proto-oncogenes que codifican para proteínas de localización nuclear ha resultado de sumo interés tanto en el campo de la oncología molecular como en los estudios concernientes a dilucidar los mecanismos que regulan el inicio de la duplicación celular. En tal sentido, ciertos genes, como el *c-myc*, se encuentran amplificados y sobreexpresados en diversas patologías neoplásicas como el cáncer de mama (Berns *et al.* 1992a; Berns *et al.* 1992b) o sufre traslocaciones en desórdenes del sistema inmune como el linfoma de Burkitt o ciertos plasmocitomas (Marcu *et al.* 1992). Por su parte, las proteínas de las familias Fos y Jun han sido ampliamente estudiadas en la inducción de la proliferación de células epiteliales y fibroblásticas y en la diferenciación de diversas células hematopoyéticas (Eisenman, 1989). Existe un sinnúmero de ejemplos en los cuales una amplia gama de estímulos mitogénicos desencadenan sus estímulos proliferativos concomitantemente con la regulación positiva de esta amplia gama de proteínas con función *trans*-activante de la transcripción en varios linajes celulares. Diversos estudios con oligonucleótidos antisentido o por microinyección de anticuerpos bloqueantes (Holt *et al.* 1986; Degols *et al.* 1991), los cuales bloquean la capacidad proliferativa de las células ante estos estímulos y otras experiencias en las cuales se transfectaron estos genes bajo la acción de promotores constitutivos (Cohen *et al.* 1989), indicarían que los productos de estos proto-oncogenes nucleares son necesarios pero no suficientes para que la inducción de la proliferación celular mediada por los agentes mitogénicos mencionados con anterioridad. Asimismo, también se ha descrito el papel fundamental que juegan genes como *c-myc* y *c-fos* en la adquisición de un fenotipo transformado por acción del *H-ras* (Ledwith *et al.* 1990; Sklar *et al.* 1991) y en el desarrollo del cáncer de mama (Watson *et al.* 1991).

Por tales motivos procedí a analizar la expresión de diversos componentes de estas familias de genes con el fin de relacionar su inducción con los parámetros proliferativos estudiados previamente.

Como fuera descrito por Bordeur *et al.* (Bordeur *et al.* 1984), estos genes se expresan en forma transiente mediante procesos cuidadosamente regulados solo en la primer



fase del estadio G<sub>1</sub>. Por tal motivo, se optimizaron las condiciones de quiescencia celular necesarias para observar la inducción mediada por los agentes en estudio. Por medio de análisis de FACS, se comprobó que tanto la alta densidad celular (inhibición por contacto) como la privación de nutrientes durante más de 16 hs, disminuyen notablemente la fracción proliferativa de los cultivos celulares. De estas dos metodologías, la inhibición por contacto mostró ser más adecuada para estudiar la inducción de la expresión de *c-fos* dado que células a baja densidad, preincubadas en medios privados de nutrientes o en medio conteniendo suero equino, resultaron incapaces de responder al EGF. De todas formas, como metodología general, el análisis de la inducción de proto-oncogenes nucleares se realizó normalmente sobre células confluentes previamente incubadas 16-20 hs en medio BSA. En estas condiciones se analizó la cinética de activación de diversos proto-oncogenes nucleares bajo la acción del EGF y del PMA.

Se comprobó que a excepción del gen *fra-1*, el cual se encuentra constitutivamente activado en MCF-10A y MCF-10T, todos los proto-oncogenes nucleares analizados (*c-fos*, *c-jun*, *fosB*, *junB*, *junD* y *c-myc*) incrementaron diferencialmente sus niveles de ARNm por el tratamiento con EGF o PMA. Cada gen exhibió una cinética transiente particular, no observándose diferencias significativas entre las dos líneas estudiadas. En general, se demostró que la activación del *c-fos* precede al resto de los proto-oncogenes mientras que éstos perduran por mayor tiempo. Ciertos genes como el *c-myc* y el *junD* evidencian estimulaciones muy débiles debido a que, en las condiciones de tratamiento, sus niveles de ARNm basales resultan muy elevados y enmascaran una posible inducción. La escasa variación en los niveles de *junD* concuerda con la descrita en diversos sistemas donde no es regulado por los mecanismos que modifican la expresión de sus congéneres (Cohen *et al.* 1989).

Asimismo, se aprecia que la inducción mediada por el promotor tumoral PMA, resulta en ciertos casos más duradera que la ejercida por el EGF. Esta diferencia en los patrones de regulación negativa entre el EGF y el PMA puede obedecer a dos mecanismos. En primer lugar, ambas drogas actúan a través de sistemas distintos, el EGF, una hormona peptídica, interactúa a través de su receptor con actividad de tirosina kinasa. Por su parte, el PMA activa directamente a diversos miembros de la familia de PKCs. Estas dos vías alternas

(aunque con capacidad de intercomunicación), inducen a los proto-oncogenes por mecanismos distintos, incluyendo los sistemas de regulación negativa. Por otra parte, el PMA, a diferencia de su análogo natural, el diacilglicerol, no es degradado rápidamente por las células, generando así una activación artificial prolongada (Issandou *et al.* 1988), mientras que la acción del EGF sigue los patrones normales de estimulación y regulación negativa (Carpenter *et al.* 1991).

Luego de estimulados, los genes de las familias *jun* y *fos*, sufren una disminución notoria en los niveles de sus ARNm debido a mecanismos autorregulatorios negativos inducidos por ellos mismos (Cohen *et al.* 1989). Este efecto se manifiesta de diversas maneras. En primer lugar, los genes de respuesta primaria, como el *c-jun* y el *c-fos* pueden ser superinducidos en presencia de un inhibidor de la síntesis proteica como la cicloheximida (CHX). Tanto las células MCF-10A como MCF-10T quiescentes son capaces de sobreexpresar el ARNm del *c-fos* por acción de la CHX y este compuesto es capaz de ejercer un efecto sinérgico con el EGF, prolongando su efecto inductor aún después de 3 hs. Esto indicaría que los sistemas necesarios para lograr la inducción de *c-fos* (y otros proto-oncogenes como *c-jun* y *c-myc*) están presentes en las células quiescentes al momento de la estimulación. De la misma forma, se deduce que se requiere la expresión y traducción de ciertas proteínas, inducidas en algunos casos por Fos-Jun, para generar una regulación negativa en la expresión de estos genes, los cuales, debido a la vida media muy corta de sus transcritos, retornan rápidamente a sus valores basales. Así mismo, en condiciones normales, una vez reprimidos, estos genes no son reestimulados hasta que la célula no reinicie su ciclo en G<sub>1</sub>. Dicha característica también ha sido verificada para *c-fos* en los modelos estudiados.

Estos hallazgos resultaron similares a las descriptas en la literatura para otros sistemas análogos (Lamph *et al.* 1988).

Al estudiar la inducción del proto-oncogén *c-fos* en diversas líneas celulares de mama, se comprobó que tanto el EGF como el PMA incrementaron notablemente los niveles de ARNm de este gen en todas las líneas estudiadas. El 4 $\alpha$ OH forbol, un análogo inactivo no esterificado del PMA, no produjo cambios en la expresión del *c-fos*, indicando que el

promotor tumoral actúa a través de la activación directa de PKC. Otras hormonas peptídicas como el PDGF (isómeros AA+BB), el IGF-I o la insulina a dosis suprafisiológicas no afectaron significativamente los niveles de dicho gen en la mayoría de las líneas estudiadas. Solamente SKBR3 resultó sensible a la acción del IGF-I y la insulina. Otros agentes como el DiBuAMPC, que mimetiza la acción del AMPC, un inductor específico de la vía de la proteína kinasa AMPC dependiente (PKA), tampoco produjo efectos valorables. La hidrocortisona exhibió un muy leve efecto estimulador en MCF-10T y SKBR3, aunque inferior al ejercido por el EGF o el PMA.

### **9.5. Rol del EGF en las líneas celulares MCF-10A y MCF-10T**

El estudio de la actividad del EGF sobre células mamarias es de fundamental importancia debido a que ha sido descrito extensivamente en la literatura la relación entre la sobreexpresión del receptor para el EGF (rEGF o c-erbB-1) (Cadena *et al.* 1992) o de una proteína análoga (HER2/neu o c-erbB-2) (Slamon *et al.* 1989) con el pronóstico desfavorable en cáncer de mama. Por otra parte, la amplificación de estos receptores en cáncer mamario suele encontrarse asociado a un bajo nivel de receptores esteroideos (Russell *et al.* 1992), un componente esencial en la aplicación de terapias hormonales en pacientes con esta patología. En tal sentido, la línea MCF-10A carece del receptor de estradiol y de progesterona (Soule *et al.* 1990) y posee un nivel elevado de receptores para EGF, alrededor de 100.000 sitio de unión por célula (Basolo *et al.* 1992). Asimismo, estudios preliminares por RT-PCR y por inmunotransferencia, indicarían que tanto MCF-10A como MCF-10T poseen niveles bajos de transcritos y proteína c-erbB-2 en comparación con MCF-7 y HBL-100, que expresan niveles medios de dicha proteína o de MDA-453 y SKBR3, las cuales sobreexpresan c-erbB-2 (datos no mostrados).

Por tal motivo, realicé un análisis más detallado de la acción de este importante agente mitogénico.

Los estudios de proliferación e inducción de entrada a la fase S del ciclo celular demostraron que, aunque en distinta medida, tanto MCF-10A como MCF-10T exhiben una dosis dependencia del EGF en ausencia de otros mitógenos con una  $EC_{50}$  alrededor de 1

ng/ml. Sin embargo, en presencia de otros agentes con actividad proliferativa, como el suero equino, la acción conjunta de la insulina e hidrocortisona o la interacción de los tres componentes, la línea MCF-10A sigue siendo dependiente del EGF para su proliferación mientras que en MCF-10T la respuesta es menor.

Si bien MCF-10T es capaz de experimentar una proliferación autócrina debido a una producción incrementada de TGF $\alpha$  y anfiregulina, los estudios de dosis dependencia del EGF y los niveles basales similares entre los diversos proto-oncogenes nucleares y otras funciones relacionadas con la activación de kinasas, indican que la proliferación autócrina no es la única causa del comportamiento diferencial en el crecimiento de MCF-10T respecto de sus congéneres normales. De esta forma, el suero equino o la combinación de insulina e hidrocortisona, si bien podrían actuar a través de la producción exacerbada de factores autócrinos (está descrita la sobreexpresión de anfiregulina mediada por el EGF), es probable que ejerzan su acción mitogénica a través de mecanismos distintos a los utilizados por el EGF. Así, en MCF-10T, por acción del *H-ras* mutado, dichos estímulos resultan suficientes para que estas células exhiban todo su potencial proliferativo aún en ausencia de EGF. En tal sentido, la acción ejercida por la sobreexpresión de el transgén *H-ras* reemplazaría los mecanismos proliferativos inducidos por EGF especialmente en presencia de otros agentes proliferativos.

Asimismo, no se descarta que el T24 *H-ras* ejerza un efecto pleiotrópico a nivel de otras proteínas que controlan los distintos pasos del ciclo de duplicación como las ciclinas o las kinasas dependiente de ciclinas o a través de agentes cuya acción consiste en inhibir la entrada al ciclo mitótico, como la pléyade de productos de diversos genes supresores tumorales.

#### **9.6. Expresión de proto-oncogenes y proliferación - Modulación de la estimulación por EGF**

Al igual que los estudios de proliferación, los diversos proto-oncogenes nucleares analizados exhibieron una respuesta dosis dependiente al EGF. El *c-fos*, en particular, se induce con una EC<sub>50</sub> de aproximadamente 0.1 ng/ml y alcanza su máxima expresión entre 1-5 ng/ml. Tanto MCF-10A como MCF-10T muestran patrones de estimulación similares.

Los diferentes perfiles de estimulación entre los niveles inducidos de *c-fos* y los índices de proliferación provocados por el EGF indican que la  $EC_{50}$  para la expresión del proto-oncogén nuclear es un orden de magnitud menor que la necesaria para inducir la proliferación celular. Esta discordancia podría deberse a las distintas metodologías empleadas para analizar ambos parámetros. En el caso de la expresión de *c-fos*, las células en estado confluyente fueron incubadas por 45 min con EGF antes de lisar las células para extraer el ARN y su posterior análisis. Experimentos no incluidos en esta Tesis demuestran que 2-3 min de incubación con EGF de células MCF-10A o MCF-10T y posterior incubación en medio BSA por 45 min, son suficientes para lograr la máxima expresión del gen *c-fos*, a niveles similares a los obtenidos por exposición continua del agente. Estos resultados coinciden con la estimulación rápida del receptor de EGF y la vía de la MAPk (ver más adelante). Por el contrario, el análisis de la proliferación celular se realiza a lo largo de 3-4 días con solo un cambio de medio. De esta manera, la internalización de las moléculas del complejo EGF-receptor, sumado a la degradación e inactivación natural de este compuesto en el medio de cultivo, sugiere que la población de células se encuentran expuestas a una dosis efectiva menor que la indicada al iniciar el tratamiento.

Como se describiera en la sección **Estudio de la proliferación de diversas líneas celulares de mama humana**, el EGF mostró ser el principal agente mitogénico en el medio de cultivo basal de las líneas celulares MCF-10. Al analizar más detalladamente su interacción con otras hormonas, se comprobó que la insulina (que *per se* es mitogénica a dosis suprafisiológicas) como la hidrocortisona (no mitogénica) favorecían la proliferación de las células MCF-10A y MCF-10T mediada por el EGF. Nuevamente, debido a la mayor proliferación basal de las MCF-10T, el efecto estimulatorio resultó más notorio en la línea MCF-10A. En el caso específico de la insulina, si bien resultó estimulatoria a dosis cercanas a la fisiológica (efecto moderado), su mayor efecto se observó a dosis elevadas, más allá del límite de especificidad para el reconocimiento de su receptor. En tal sentido, experimentos realizados con IGF-I, cuyo receptor podría ser estimulado por dosis elevadas de insulina, indicaronn que este polipéptido también resulta mitogénico para estas líneas celulares. A dosis inferiores de 100 ng/ml, es levemente más potente que la insulina para estimular la

proliferación por sí mismo o en presencia de EGF (datos no mostrados). Sin embargo, el efecto del IGF-I, aún en dosis que resultan máximas para asegurar la especificidad de su acción, no alcanzó a mimetizar la acción de la insulina en concentraciones altas, indicando que la insulina es capaz de ejercer un efecto específico *per se*. De todas formas, es probable que el efecto final de la insulina esté mediado, aunque parcialmente, por el receptor de IGF-I. Trabajos realizados en diversas líneas celulares de mama indican que la insulina resulta inductora de la síntesis de ADN a dosis tan bajas como 1 nM (aprox 6 ng/ml) y este efecto es parcialmente inhibido por el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ IR3 (bloqueante del receptor de IGF-I) en las líneas celulares MCF-7 y 184B5, pero no en otras líneas como T47D y ZR-75-1 (Milazzo *et al.* 1992). Esto indica que no son necesarias dosis elevadas de insulina para activar al receptor de IGF-I.

Al analizar un posible correlato molecular a nivel de la expresión de proto-oncogenes nucleares entre las acciones sinérgicas de los diversos compuestos estudiados, se demostró que el EGF incrementó los niveles de ARNm de diversos proto-oncogenes nucleares como *c-fos*, *junB* y *fosB* y que la adición conjunta con los otros agentes: hidrocortisona, insulina o IGF-I, no modificaron notablemente los niveles inducidos por EGF. Experimentos realizados con suero equino arrojaron resultados similares. Tanto el suero equino como el EGF provocaron una estimulación máxima de *c-fos* no observándose cambio alguno por interacción con los otros agentes, aún con la combinación EGF y suero equino.

Esto indica que el efecto potenciador sobre la proliferación de estas líneas celulares no es controlado a través de las señales iniciales que disparan los mecanismos de división celular, sino que ejercen su acción a niveles de regulación posteriores o a través de sistemas de control paralelos que no involucran la participación de proto-oncogenes nucleares. En tal sentido es necesario destacar que la insulina a altas dosis como el IGF-I poseen actividad mitogénica intrínseca independientemente de la estimulación de los genes de expresión temprana detallados en esta Tesis. La hidrocortisona, por su parte, que en ocasiones exhibe una leve acción inductora sobre la expresión de *c-fos* (aunque en niveles notoriamente inferiores a los producidos por el EGF o el PMA), no afecta individualmente la proliferación celular.

Esto sugiere que en las líneas celulares MCF-10A y MCF-10T, la sobreexpresión inducida de ciertos proto-oncogenes nucleares no sería estrictamente necesaria para iniciar o continuar el ciclo celular. Sin embargo, en diversos sistemas se ha descrito el requerimiento de proteínas Fos o Myc para el comienzo de la fase S del ciclo celular (Kovary *et al.* 1991). En las líneas aquí estudiadas, es concebible que los altos niveles basales de genes como *c-jun* o *c-myc* (inducibles), *fra1* o *junD* (no inducibles) o de algún otro gen de expresión temprana no analizado, resulten suficientes para conducir a la célula hacia su duplicación frente a estímulos que no activan a prototipos de oncogenes nucleares como *c-fos*.

### **9.7. Expresión del proto-oncogén *c-myc***

Como fuera descrito anteriormente, las líneas celulares MCF-10A y MCF-10T exhibieron niveles basales elevados de *c-myc*. Este fenómeno se observó tanto en células proliferantes como en células arrestadas por alta densidad y privadas de factores de crecimiento. En estas últimas condiciones, ambas líneas mostraron una escasa inducción de este gen ante diversos estímulos capaces de regular la transcripción de genes del complejo AP-1.

Sin embargo, se observó que células MCF-10A como MCF-10T, mantenidas en un medio suplementado con factores de crecimiento, como es el medio HS, exhibieron una rápida disminución en los niveles de ARNm de *c-myc* luego del reemplazo de este medio por medio BSA (sin nutrientes). La cinética de este fenómeno indica que el proceso se inicia rápidamente y los transcritos para *c-myc* disminuyen notoriamente 2 hs post-remoción del medio. Este no se observó con medio BSA suplementado con un agente inductor como el EGF o el PMA (dato no mostrado). Sin embargo, 18 hs después, *c-myc* reestablece sus valores basales constitutivos. Este hallazgo resultó más relevante en cultivos de baja densidad que confluentes. Independientemente de los tratamientos previos (medio HS, medio BSA durante 2 hs o 18 hs), el EGF indujo idénticos niveles de ARNm para *c-myc*.

Este resultado fue privativo de las células del linaje MCF-10 pues dos líneas neoplásicas, MCF-7 y SKBR3, las cuales poseen niveles basales bajos de *c-myc* en condiciones proliferativas, no evidenciaron regulación negativa de este proto-oncogén por

remoción del medio con nutrientes. En ambas líneas, el EGF y el PMA fueron capaces de inducir la expresión de *c-myc*.

El descenso en los niveles del *c-myc* podría deberse a un mecanismo de regulación negativa en ausencia de factores mitogénicos. Un fenómeno similar fue descrito por M. Dean (Dean *et al.* 1986) en fibroblastos de ratón. El retorno a niveles elevados de expresión luego de una incubación prolongada en medio sin nutrientes puede atribuirse a una estimulación autócrina de estas células. Cabe recordar que tanto la línea MCF-10A como MCF-10T son capaces, en distinta medida, de secretar TGF $\alpha$ .

Es plausible deducir, por lo tanto, que diversas condiciones extracelulares, como la presencia de factores de crecimiento y la densidad celular, ejercen un control rápido y estricto sobre los niveles basales de transcritos del proto-oncogén *c-myc* en las líneas celulares de mama MCF-10A y MCF-10T.

#### **9.8. TGF $\beta$ como agente inhibitorio de proliferación - Regulación de *c-myc***

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) consiste en una familia de polipéptidos estructuralmente relacionados y sus receptores se encuentran en un gran número de linajes celulares (Lyons *et al.* 1990). La naturaleza de la respuesta biológica del TGF $\beta$ 1 depende del sistema celular en el que actúa. Aunque fue descubierto por su capacidad de estimular la proliferación de fibroblastos murinos en medio semisólido, el TGF $\beta$ 1 es el más potente polipéptido inhibidor de la proliferación celular conocido pudiendo ejercer dicho efecto sobre un gran número de líneas epiteliales, endoteliales y del sistema inmune (Carpenter *et al.* 1991). Sin embargo, esta respuesta inhibitoria no se manifiesta en diversas líneas epiteliales neoplásicas y ciertas células de mama tumoral exhiben una expresión disminuida de TGF $\beta$ 1 (Lippman *et al.* 1986).

Análisis descriptos en esta Tesis demostraron que el TGF $\beta$ 1 disminuye la proliferación de líneas celulares de mama normales y tumorigénicas.

Estudios en queratinocitos indicaron que el TGF $\beta$ 1 inhibe el crecimiento concomitantemente con el bloqueo en la transcripción del proto-oncogén *c-myc*,



posiblemente mediada por la acción de la p105<sup>Rb</sup> (Pientenpol *et al.* 1990). En tal sentido, la incubación de células MCF-10A como MCF-10T con TGFβ1 (5 ng/ml) produjo una drástica disminución en los niveles de ARNm del *c-myc* independientemente de la densidad celular o de la composición del medio. En dichas condiciones, las células mantienen su capacidad de inducir *c-myc* o *c-fos* cuando fueron tratadas con EGF. Cabe destacar que son necesarias incubaciones prolongadas con TGFβ1 (18 hs) para observar el efecto inhibitorio sobre los transcritos de *c-myc* pues tratamientos por 2 hs no produjeron efecto alguno. Podemos concluir que la regulación del *c-myc* ejercida por el TGFβ1 difiere del mecanismo que tiene lugar en la regulación por contacto celular o por la presencia continua de nutrientes descripto anteriormente.

### **9.9. PMA y proliferación celular**

Los ésteres de forbol son potentes promotores tumorales *in vivo* y exhiben una amplia gama de efectos pleiotrópicos *in vitro* (Diamond *et al.* 1980). El PMA es un éster de forbol con importante actividad en la promoción tumoral. En distintos sistemas biológicos puede estimular la proliferación o inhibir la diferenciación, aunque también es capaz de inhibir el crecimiento o promover la diferenciación. Independientemente del efecto final, se considera que el PMA ejerce su acción a través de la estimulación directa de miembros de la familia de PKC (proteína kinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup> y fosfolípidos) (Issandou *et al.* 1986). En tal sentido, el PMA actuaría mimetizando uno de los activadores naturales de PKC, el diacilglicerol (DAG) (Blumberg *et al.* 1984).

Ha sido ampliamente descripto que en células provenientes de tejido epitelial mamario, el PMA disminuye notablemente la proliferación de las mismas. En células MCF-7, un prototipo de línea neoplásica mamaria utilizada en estos estudios, inhibe su proliferación en forma dosis dependiente con respecto a promotores tumorales activos y por análogos del DAG. La inhibición mediada por PMA está acompañada por modulación en la actividad de PKC (Issandou *et al.* 1988), marcados cambios en la morfología celular (extensión del retículo endoplásmico granulado, aparición de gránulos secretorios) y bloqueo en G<sub>1</sub> (Valette

*et al.* 1987), ruptura de ADN e incremento en la actividad de las ADN topoisomerasas I y II, enzimas que regulan la superhelicidad del ADN (Baldi *et al.* 1993).

En la mayoría de los sistemas biológicos estudiados, la activación de PKC por PMA induce la expresión de diversos proto-oncogenes nucleares. Es así que he demostrado que el PMA aumentó los niveles de ARNm diversos genes de la familias *fos*, *jun* y *myc* en forma similar a la ejercida por mitógeno EGF en las líneas celulares estudiadas, independientemente de su origen o estado de transformación.

Estudios sobre proliferación de las líneas MCF-10A, MCF-10T y MCF-7 indicaron que el PMA ejerce un efecto inhibitorio en forma dosis dependiente, con una IC<sub>50</sub> en el rango de 1-5 nM. El análogo inactivo del PMA, el 4 $\alpha$ OH forbol, no indujo variaciones significativas en la proliferación ni en la expresión de proto-oncogenes nucleares, esto indicaa que el PMA actúa a través de receptores específicos.

Existe gran número de trabajos que correlacionan la acción del PMA con una rápida desensibilización del receptor para EGF. Este receptor es un sustrato natural de la PKC fosforilándolo en el residuo treonina 654 del dominio intracitoplasmático (Carpenter *et al.* 1991). Por otra parte, se ha descripto un efecto diferencial de acuerdo al estado del receptor para estradiol: el PMA disminuye el número de sitios de unión del EGF en células de origen mamario que contienen receptores estrogénicos, sin afectar su afinidad. Por el contrario, en células receptor negativas, no se observaron cambios significativos en el número de receptores para EGF existiendo sin embargo una relación entre inhibición en la proliferación y disminución de la afinidad del receptor por su ligando (Koga *et al.* 1990). Otros autores han descripto una correlación inversa entre la dependencia a hormonas esteroideas y los niveles de receptor de EGF en tumores y líneas celulares de mama (van Agthoven *et al.* 1992).

Los estudios realizados en esta Tesis demuestran que MCF-10A y MCF-10T poseen niveles similares de sitios de unión para el EGF y que éstos disminuyen notoriamente por acción del PMA en función de la dosis con una IC<sub>50</sub> aproximada de 1 nM, similar a la obtenida en los ensayos sobre inhibición de la proliferación. La desensibilización del receptor para EGF alcanza su máximo luego de la 2 hs de exposición al PMA. Sin embargo, el promotor tumoral ejerce una acción irreversible a tiempos tan cortos como 15 min, luego de

los cuales, es innecesaria su presencia para que los mecanismos ya activados desensibilicen al receptor y reduzcan la unión del EGF a niveles similares a los obtenidos por exposición continua con PMA. Por otra parte, la staurosporina, un inhibidor específico de la PKC, revierte en forma dosis dependiente ( $IC_{50}$  ca. 10nM) el efecto inducido por 10 nM del PMA. Estudios realizados con dicho inhibidor indicarían que la principal vía de acción del EGF no es a través de la activación de PKC. Es así, que dosis 100 veces superiores a las necesarias para inhibir la desensibilización del receptor de EGF mediada por PMA a través de la PKC, resultaron insuficientes para atenuar la inducción de proto-oncogenes nucleares por el EGF. En los mismos ensayos, la staurosporina en concentraciones entre 0.1-1  $\mu$ M resultaron efectivas para inhibir la inducción de proto-oncogenes nucleares inducida por el PMA.

Dada la importancia que posee el EGF para el crecimiento de estas líneas celulares, es probable que la inhibición observada en la proliferación sea en parte debida a la incapacidad de este mitógeno en activar su receptor específico. Sin embargo, como fuera descripto anteriormente, ambas líneas celulares fueron capaces de proliferar en ausencia de EGF (aunque a un ritmo menor) en medio de cultivo conteniendo suero equino, insulina e hidrocortisona. En particular, la línea MCF-10T posee mayor capacidad proliferativa que MCF-10A aunque la desensibilización observada es similar entre ambas. Por otra parte, el PMA, a través de su receptor específico, la PKC, es capaz de inducir la respuesta mitogénica primaria a través de la activación de los proto-oncogenes nucleares y de otros mecanismos involucrados en la transducción de señales mitogénicas como las MAPk (ver más adelante). Si embargo, la activación continua de la PKC, o probablemente su desensibilización, alterarían mecanismos posteriores necesarios para el normal desarrollo de la duplicación celular con la consiguiente inhibición de la proliferación. Cabe destacar que los efectos inducidos por el PMA a este nivel resultaron irreversibles, pues células tratadas al menos 24 hs con este agente no recuperaron su capacidad proliferativa cuando los cultivos continuaron en ausencia del promotor tumoral.

### 9.10. Análisis de la activación de MAPk

En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo para descifrar la complicada red de señales que se propagan en una célula cuando ésta es activada por un mitógeno que interactúa con su receptor en la superficie celular. En tal sentido, se ha detallado el mecanismo de activación originado cuando un ligando reconoce un receptor con actividad tirosina kinasa. Ello involucra una compleja cascada de eventos de fosforilación y translocación intracelular de proteínas, hasta que dicha señal se transmite al núcleo activando diversos proto-oncogenes nucleares u otros genes reguladores de la transcripción. Estos actuarán posteriormente como "terceros mensajeros" permitiendo la transcripción específica de genes necesarios para la duplicación celular. En el caso particular del EGF, se ha descrito que ejerce su acción a través de la "vía de las MAP kinasas" (ver INTRODUCCION).

Para corroborar que el estímulo mitogénico iniciado por el EGF en las líneas celulares MCF-10A y MCF-10T, con el subsecuente incremento en los niveles de ARNm de ciertos proto-oncogenes nucleares, comprometía los mecanismos mencionados, analicé la actividad de dichas enzimas y la presencia de fosfotirosina en el receptor de EGF en cultivos expuestos a dicho agente.

Se demostró que las líneas celulares de mama humana analizadas exhiben diferentes niveles de las dos isoformas más conocidas de kinasas reguladas por estímulos extracelulares (ERKs). Las células del linaje MCF-10 expresan únicamente  $p42^{ERK-2}$  mientras que las provenientes de tejido neoplásico poseen niveles elevados de la variante de menor movilidad electroforética:  $p44^{ERK-1}$ . Por su parte, HBL-100 expresa niveles similares de ambas proteínas.

La incubación de ambas células con EGF indujo una notable y rápida autofosforilación en tirosina en su receptor concomitantemente con la fosforilación de  $p42^{ERK-2}$ , a juzgar por el retardo en la migración de la proteína fosforilada respecto de la enzima inactiva. Estos efectos fueron transientes, retornando a sus niveles basales a los 60 y 40 min respectivamente. Si bien la inducción máxima del proto-oncogén *c-fos* ocurre a los 40 min, la rápida activación de la vía de MAPk coincide con ensayos donde se demostró que

solo se requieren 2-3 min de incubación con EGF para iniciar los mecanismos que incrementan los transcritos de proto-oncogenes nucleares (datos no mostrados).

Asimismo, se corroboró que la activación de esta vía es dependiente de la concentración de EGF.

#### **9.11. Efecto de inductores de cAMP sobre la proliferación y la actividad de MAPk**

En ciertos sistemas donde la inducción del cAMP resulta inhibitorio de la proliferación celular, se ha establecido que, en parte, dicha inhibición es mediada por la fosforilación de c-Raf a través de PKA con la consiguiente inactivación de la "vía de las MAPk" (Cook *et al.* 1993; Wu *et al.* 1993). En tal sentido, se ha demostrado el papel del AMPc en la inhibición de la proliferación en líneas celulares de mama como MCF-7 y en tumores mamarios inducidos en rata (Cho-Chung *et al.* 1983; Fontana *et al.* 1987). Estudios sobre proliferación celular realizados con agentes que provocan un aumento en los niveles intracelulares de AMPc, como la toxina de cólera o la prostanglandina E<sub>2</sub>, mostraron una inhibición del crecimiento en diversas líneas de mama como MCF-7 MDA-453 y HBL-100, no afectando la duplicación de MCF-10A y MCF-10T.

A nivel molecular, se describió que la inactivación de la "vía de las MAPk" no es el principal mecanismo de la inhibición mediada por AMPc. Ello se deduce de que, en ninguna de las líneas estudiadas, el DiBuAMPc afectó la activación de ERKs o la autofosforilación rEGF en cultivos expuestos a EGF.

Dichos ensayos demostraron además que ni la insulina ni el IGF-I ejercen su acción a través de estos mecanismos.

Por lo tanto, se ha descrito la activación de diversos proto-oncogenes nucleares por la acción de agentes entre los que se incluyen hormonas peptídicas y promotores tumorales. Entre ellos se destacan el EGF y el PMA como los más potentes inductores de estos genes, en particular aquellos pertenecientes a las familias *fos*, *jun* y *myc*. Dado que el EGF posee acción mitogénica sobre las líneas de células mamarias estudiadas (tanto normales como tumorigénicas), mientras que el PMA ejerce un efecto inhibitorio sobre la proliferación de estas células, se concluye que la activación de genes de respuesta primaria como los proto-oncogenes nucleares resultan insuficientes para iniciar la cascada de eventos que concluirían en el proceso de división celular, siendo necesarios mecanismos accesorios para tal fin. De igual manera, la acción mitogénica de la insulina o el IGF-I, que no modifican la expresión de mensajeros de los proto-oncogenes aquí descritos, indica que dicha inducción no resultaría necesaria para desencadenar la división celular. Dichos mitógenos pueden actuar a través de mecanismos paralelos, siendo suficientes los niveles basales de ciertos proto-oncogenes nucleares como *c-myc*, *c-jun* o *fra-1* naturalmente elevados en estas líneas celulares; o podrían estar induciendo otros genes con funciones similares no analizados en esta Tesis.

Así mismo, se ha descrito la expresión cuasi-constitutiva del gen *c-myc* en las líneas MCF-10A y MCF-10T, su regulación por el agente inhibidor TGF $\beta$ 1 y por mecanismos extracelulares que incluyen la densidad celular y la presencia continua de factores mitogénicos y su inducibilidad por el EGF en las condiciones adecuadas.

Por último, se ha descrito que la transformación in vitro de células en cultivo normales de mama por un oncogén activo *H-ras*, altera en forma pleiotrópica diversas funciones celulares relacionadas con tumorigenicidad, crecimiento en ausencia de sustrato sólido, requerimiento de nutrientes y cambios morfológicos, sin afectar los mecanismos iniciales involucrados en la duplicación celular, en particular, aquellos eventos primarios como la expresión de proto-oncogenes nucleares o la activación de la “vía de las MAPk” las cuales conducen a la inducción mediada por EGF de dichos genes.



## 10. CONCLUSIONES

1. Caracterización molecular de MCF-10T: se comprobó su resistencia a G418, presencia genómica de *H-ras* mutado, sobre-expresión de *H-ras*, proliferación independiente de anclaje. Inhibición por contacto: arresto proliferativo cuando alcanzan elevada densidad celular.

2. Las líneas celulares provenientes de tejido no tumorigénico exhiben un tiempo de duplicación menor que las neoplásicas en condiciones favorables de nutrientes. En ausencia de factores exógenos, las células con fenotipo transformado proliferan mientras que MCF-10A no sobreviven.

3. En quiescencia, la mayoría de los proto-oncogenes nucleares analizados son inducidos por EGF o PMA con cinéticas particulares para cada uno de ellos y con patrones similares entre MCF-10A y MCF-10T.

4. EGF induce un notable estímulo proliferativo en células MCF-10A y MCF-10T. MCF-10A es dependiente del EGF, mientras que MCF-10T solo es sensible a este agente en ausencia de otros factores mitogénicos.

5. EGF y PMA estimulan la expresión de *c-fos* en MCF-10A y MCF-10T mientras que otros estímulos mitogénicos como insulina o IGF-I resultan ineficaces. *c-fos* no es estrictamente necesario para los procesos de división celular.

6. La combinación de uno o más agentes potencian la proliferación mediada por el EGF, sin alterar los niveles inducidos de ARNm de proto-oncogenes nucleares.

7. Los niveles de transcritos de proto-oncogenes nucleares son dependientes de la dosis de EGF.

8. Las líneas celulares de mama humana analizadas poseen niveles diferentes de ERKs según su origen.



9. EGF indujo en forma temporaria la autofosforilación de su receptor concomitantemente con el aumento en la activación de ERK-2 en MCF-10A.

10. Agentes que aumentan los niveles de AMPc resultan inhibitorios de la proliferación en diversas líneas de mama (excepto MCF-10A y MCF-10T) sin afectar la vía de las MAPk.

11. Insulina e IGF-I no actúan a través de la activación de MAPk.

12. La transformación por *H-ras* en células de mama disminuye sus requerimientos de nutrientes exógenos para su duplicación sin alterar notablemente los mecanismos involucrados en la respuesta primaria a estímulos mitogénicos.

13. Las condiciones extracelulares que modulan la proliferación, como factores de crecimiento y contacto celular, ejercen un control rápido y específico sobre los niveles basales de transcritos de *c-myc* en las líneas celulares MCF-10A y MCF-10T.

14. No se observaron variaciones en los niveles de inducción de *c-myc* respecto de las condiciones previas a los tratamientos.

15. El TGF $\beta$ 1, un regulador negativo de la proliferación de células de mama, disminuye los niveles de ARNm de *c-myc* sin afectar su inducibilidad por EGF.

16. El PMA, un promotor tumoral que es capaz de incrementar los niveles de ARNm de diversos proto-oncogenes nucleares analizados (en forma similar a la ejercida por el EGF), resultó inhibitorio de la proliferación de diversas líneas celulares de mama y redujo parcialmente la unión del EGF a su receptor a través de su sustrato natural, la PKC.

## 11. BIBLIOGRAFIA

- Angel, P. & Karin, M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta. Rev. Cancer.* **1072**, 129-157.
- Aussubel, F.M. (1989) Short protocols in molecular biology. Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York
- Baldi, A., Crespi, M.D., Castro, G., Wittliff, J.L., Shayo, C.C., Annibali, N.V. & Mladovan, A.G. (1993) Molecular mechanism implicated in the control of cell growth in human breast cancer cells. *Biocell* **17**, 133-144.
- Barbacid, M. (1987) Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 779-828.
- Barbacid, M. (1990) ras Oncogenes: Their role in neoplasia. *Eur. J. Clin. Invest.* **20**, 225-235.
- Basolo, F., Elliott, J., Tait, L., Chen, X.Q., Maloney, T., Russo, I.H., Pauley, R., Momiki, S., Caamano, J., Klein-Szanto, A.J.P., et al (1991) Transformation of human breast epithelial cells by c-Ha-ras oncogene. *Mol. Carcinog.* **4**, 25-35.
- Basolo, F., Serra, C., Ciardiello, F., Fiore, L., Russo, J., Campani, D., Dolei, A., Squartini, F. & Toniolo, A. (1992) Regulation of surface-differentiation molecules by epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, and hydrocortisone in human mammary epithelial cells transformed by an activated c-Ha-ras proto-oncogene. *Int. J. Cancer.* **51**, 634-640.
- Berns, E.M.J.J., Fockens, J.A., Van Putten, W.L.J., Van Staveren, I.L., Portengen, H., De Koning, W.C.H. & Klijn, J.G.M. (1992a) Prognostic factors in human primary breast cancer: Comparison of c-myc and HER2/neu amplification. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **43**, 13-19.
- Berns, E.M.J.J., Klijn, J.G.M., Van Putten, W.L.J., Van Staveren, I.L., Portengen, H. & Fockens, J.A. (1992b) c-myc Amplification is a better prognostic factor than HER2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer. Res.* **52**, 1107-1113.
- Beug, H., Claviez, M., Jockush, B.M. & Graf, T. (1978) Differential expression of Rous sarcoma virus-specific transformation parameters in enucleated cells. *Cell* **14**, 843-856.
- Bishop, J.M. (1983) Cellular oncogenes and retroviruses. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 301-354.
- Blackwood, E.M. & Eisenman, R.N. (1991) Max: A helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* **251**, 1211-1217.
- Blackwood, E.M., Lüscher, B. & Eisenman, R.N. (1992) Myc and Max associate in vivo. *Genes Dev.* **6**, 71-80.
- Blumberg, P.M., Jaken, S., Konig, B., Sharkey, N.A. & Leach, K.L. (1984) Mechanism of action of the phorbol ester tumor promoters: specific receptors for lipophilic ligand. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 933-940.
- Bordeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E. & Bishop, J.M. (1984) Amplification of N-myc in untreated human neuroblastoma correlates with advanced stage disease. *Science* **224**, 1121-1124.
- Bos, J.L. (1989) ras Oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res.* **49**, 4682-4689.

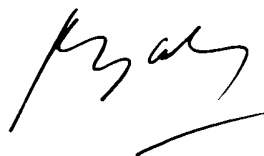
- Bravo, R., Burckhardt, J. & Muller, R. (1985) Persistence of the competent state in mouse fibroblasts is independent of c-fos and c-myc expression. *Exp. Cell Res.* **160**, 540-548.
- Burgering, B.M.T. & Bos, J.L. (1995) Regulation of ras-mediated signaling; more than one way to skin a cat. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 18-22.
- Cadena, D.L. & Gill, G.N. (1992) Receptor tyrosine kinases. *FASEB. J.* **6**, 2332-2337.
- Cano, E. & Mahadevan, L.C. (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 117-122.
- Caron de Fromentel, C., Nardeux, P.C., Soressi, T., Lavialle, C., Estrade, C., Carloni, G., Chandrasekaran, K. & Carsingna, R. (1985) Epithelial HBL-100 cell line derived from milk of an apparently healthy woman harbors SV40 genetic information. *Exp. Cell Res.* **16**, 83-94.
- Carpenter, G. & Wahl, M.I. (1991) in Peptide growth factors and their receptors (Sporn, M.B. & Roberts, A.B. eds.). The epidermal growth factor family. pp. 69-172, Springer-Verlag, New York
- Chen, P.L., Sellers, T.A., Rich, S.S., Potter, J.D. & Folsom, A.R. (1995) Segregation analysis of breast cancer in a population-based sample of postmenopausal probands: The Iowa Women's Health Study. *Genet. Epidemiol.* **12**, 401-415.
- Cho-Chung, Y.S., Clair, T., Shephard, C. & Berghoffer, B. (1983) Arrest of hormone-dependent mammary cancer growth in vivo and in vitro by cholera toxin. *Cancer Res.* **43**, 1473-1476.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Chrysogelos, S.A. & Dickson, R.B. (1994) EGF receptor expression, regulation, and function in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **29**, 29-40.
- Ciardiello, F., McGeady, F., Kim, M.L., Basolo, F., Hynes, N.E., Langton, B.C., Yokozaki, H., Sacki, T., Elliott, J.W., Masui, H., et al (1990) TGF $\alpha$  expression is enhanced in human mammary epithelial cells transformed by an activated c-Ha-ras proto-oncogene but not by the c-neu proto-oncogene, and overexpression of the TGF $\alpha$  cDNA leads to transformation. *Cell Growth & Diff.* **1**, 407-420.
- Cohen, D.R. & Curran, T. (1989) The structure and function of the fos proto-oncogene. *Oncogenesis* **1**, 65-88.
- Cook, S.J. & McCormick, F. (1993) Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* **262**, 1069-1071.
- Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T. & Gutkind, J.S. (1995) The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**, 1137-1146.
- Curran, T. (1988a) in The oncogene handbook (Reddy, E.P. ed.), fos. pp. 307-326, Elsevier Science Publ. The Netherlands
- Curran, T. & Fianza, B.R., Jr. (1988b) Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell* **55**, 395-397.
- Darbon, J.M., Valette, A. & Bayard, F. (1986) Phorbol esters inhibit the proliferation of MCF-7 cells: Possible implication of protein kinase C. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 2683-2686.

- Davis, R.J. (1993) The MAPk signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **268**, 14553-14556.
- Davis, R.J. (1994) MAPk: new JNK expands the group. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 470-473.
- Dean, M., Levine, R.A., Wendy, R., Kindy, M.S., Sonenshein, G.E. & Campisi, J. (1986) Regulation of c-myc transcription and mRNA abundance by serum growth factors and cell contact. *J. Biol. Chem.* **261**, 9161-9166.
- Degols, G., Leonetti, J.P., Mechti, N. & Lebleu, B. (1991) Antiproliferative effects of antisense oligonucleotides directed to the RNA of c-myc oncogene. *Nucleic. Acids. Res.* **19**, 945-948.
- Diamond, L., O'Brien, T.G. & Baird, W. (1980) Tumor promoters and the mechanism of tumor promotion. *Adv. Cancer Res.* **32**, 1-74.
- Doll, R. (1992) The lessons of life: keynote address to the nutrition and cancer conference. *Cancer Res.* **52**, 2024s-2029s.
- Doyle, A., Griffins, J.B. & Newell, D.G. (1994) Cell & tissue culture: laboratory procedures. John Wiley & Sons, England
- Eisenman, R.N. (1989) in *Oncogenes and the molecular origins of cancer* (Weinberg, R.A. ed.), Nuclear oncogenes. pp. 175-222, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Escot, C., Theillet, C., Lidereau, R., Syratos, F., Champeme, M.H., Gest, J. & Callahan, R. (1986) Genetic alterations of the c-myc protooncogene in human primary breast carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4834-4838.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-11.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. (1984) Addendum: a technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **137**, 266-270.
- Fontana, J.A., Miksis, G., Miranda, D.M. & Durham, J.P. (1987) Inhibition of human mammary carcinoma cell proliferation by retinoids and intracellular cAMP-elevating compounds. *JNCI* **78**, 1107-1112.
- Fourney, R.M., Mishakoshi, J., Day III, R.S. & Paterson, M.C. (1988) Northern blotting: efficient RNA staining and transfer. *Focus* **10**, 5-7.
- Gannon, J.V., Greaves, R., Iggo, R. & Lane, D. (1990) Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J.* **9**, 1595-1602.
- Goralczyk, R., Closs, E.I., Rüther, U., Wagner, E.F., Strauss, P.G., Erfle, V. & Schmidt, J. (1990) Characterization of fos-induced osteogenic tumours and tumour-derived murine cell lines. *Differentiation* **44**, 122-131.
- Grand, R.J.A. & Owen, D. (1991) The biochemistry of ras p21. *Biochem. J.* **279**, 609-631.
- Harlow, E., Crawford, L.V., Pim, D.C. & Williamson, N.M. (1981) Monoclonal antibodies specific for simian virus 40 tumor antigens. *J. Virol.* **39**, 861-869.
- Holt, J.T., Gopal, T.V., Moulton, A.D. & Nienhuis, A.W. (1986) Inducible production of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4794-4798.

- Hordijk, P.L., Verlaan, I., Jalink, K., van Corven, E.J. & Moolenaar, W.H. (1994) cAMP abrogates the p21ras-MAPk pathway in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **269**, 3534-3538.
- Huber, B. (1989) Therapeutic opportunities involving cellular oncogenes: novel approaches fostered by biotechnology. *FASEB J.* **3**, 5-13.
- Issandou, M., Bayard, F. & Darbon, J.M. (1986) Activation by phorbol esters of PKC in MCF-7 human breast cancer cells. *FEBS Letters* **200**, 337-342.
- Issandou, M., Bayard, F. & Darbon, J.M. (1988) Inhibition of MCF-7 cell growth by 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate and 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol: distinct effects on protein kinase C activity. *Cancer Res.* **48**, 6943-6950.
- Karin, M. & Smeal, T. (1992) Control of transcription factor by signal transduction pathway: the beginin of the end. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 418-422.
- Kato, G.J. & Dang, C.V. (1992) Function of the c-myc oncoprotein. *FASEB J.* **6**, 3065-3071.
- Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D. & Leder, P. (1983) Cell specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and PDGF. *Cell* **35**, 603-610.
- Koga, M., Musgrove, E.A. & Sutherland, R.L. (1990) Differential effects of phorbol ester on EGF receptors in estrogen receptor-positive and -negative breast cancer cell lines. *Cancer Res.* **50**, 4849-4855.
- Kovary, K. & Bravo, R. (1991) The JUN and FOS protein families are both requiered for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* **11**, 4466-4472.
- Labarca, C. & Paigen, M. (1980) Fluorescence quantification of DNA. *Anal. Biochem.* **102**, 344-352.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-683.
- Lamph, W.W., Wamsley, P., Sassone-Corsi, P. & Verma, I.M. (1988) Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature* **334**, 629-631.
- Land, H., Parada, L.F. & Wainberg, M.A. (1983) Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requieres at least two cooperating oncogenes. *Nature* **304**, 596-602.
- Ledwith, B.J., Manam, S., Kraynak, A.R., Nichols, W.W. & Bradley, M.O. (1990) Antisense-fos RNA causes partial reversion of the transformed phenotypes induced by the c-Ha-ras oncogene. *Mol. Cell Biol.* **10**, 1545-1555.
- Leinoine, N.R. (1990) in *Genes and cancer* (Carney, D. & Smith, J.A. eds.), c-ras oncogenes and GAP. pp. 19-30. John Wiley & Sons Ltd. England
- Lin, A., Frost, J., Deng, T., Smeal, T., Al-Alawi, N., Kikkawa, U., Hunter, T., Brenner, D. & Karin, M. (1992) Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell.* **70**, 777-789.
- Lippman, M.E., Dickson, R.B., Kasid, A., Gelman, E.P., Davidson, N. & et al. (1986) Autocrine and paracrine growth regulation of human breast cancer. *J. Steroid Biochem.* **24**, 147-154.
- Little, C.D., Nau, M.M., Carney, D.N., Gazdar, A.F. & Minna, J.D. (1983) Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* **306**, 345-347.

- Lyons, R.M. & Moses, H.L. (1990) TGF and the regulation of cell proliferation. *Eur. J. Biochem.* **187**, 467-473.
- Maki, Y., Bos, T.J., Davis, C., Starbuck, M. & Vogt, P.K. (1987) Avian sarcoma virus 17 carries de jun oncogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2848-2852.
- Maloney Paine, T., Fontanini, G., Basolo, F., Geronimo, I., Elliott, J.W. & Russo, J. (1992) Mutated C-Ha-ras oncogene alters cytokeratin expression in the human breast epithelial cell line MCF-10A. *Am. J. Pathol.* **140**, 1483-1488.
- Marcu, K.B., Bossone, S.A. & Patel, A.J. (1992) Myc function and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 809-860.
- Martin, G.S. (1970) Function required for the maintenance of the transformed state. *Nature* **227**, 1021-1023.
- Martin, G.S. & Duesberg, P.H. (1972) The A subunit in the RNA transforming viruses. *Virology* **47**, 494-497.
- Marx, J. (1994) Oncogenes reach a milestone. *Science* **266**, 1942-1944.
- Milazzo, G., Giorgino, F., Damante, G., Sung, C., Stampfer, M.R., Vigneri, R., Goldfine, I.D. & Belfiore, A. (1992) Insulin receptor expression and function in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* **52**, 3924-3930.
- Muller, R., Bravo, R., Burckhardt, J. & Curran, T. (1988) Induction of the c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature* **332**, 716-720.
- Norimanno, N., Selvam, M.P., Qi, C.F., Sacki, T., Johnson, G., Kim, N., Ciardiello, F., Shoyab, M., Plowman, G. & Brandt, R. (1994) Amphiregulin as an autocrine growth factor for c-Ha-ras- and c-erbB-2-transformed human mammary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 2790-2794.
- Pelech, S.L. & Sanghera, J.S. (1992) Mitogen-activated protein kinases: versatile transducers for cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 233-237.
- Pientenpol, J.A., Stein, R.H., Moran, E., Yaciuk, P., Schiegel, R., Lyons, R.M., Pittelkow, M.R., Munger, K., Howley, P.M. & Moses, H.L. (1990) TGF- $\beta$ 1 inhibition of c-myc transcription in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRb binding domains. *Cell* **777-785**.
- Rous, P. (1911) Transmission of a malignant new growth by means of a cell free filtrate. *J. Am Med. Assoc.* **56**, 198.
- Russell, K.S. & Hung, M. (1992) Transcriptional repression of the neu protooncogene by estradiol stimulated estrogen receptor. *Cancer Res.* **52**, 6624-6629.
- Russo, J. & Russo, I.H. (1987) Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab. Invest.* **57**, 112-137.
- Russo, J., Tait, L. & Russo, I.H. (1991) Morphological expression of cell transformation induced by c-Ha-ras oncogene in human breast epithelial cells. *J. Cell. Sci.* **99**, 453-463.
- Ryan, K.M. & Birnie, G.D. (1996) Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem J* **314**, 713-721.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

- Sklar, M.D., Thompson, E., Welsh, M.J., Liebert, M., Harney, J., Grossman, H.B., Smith, M. & Prochownik, E.V. (1991) Depletion of c-myc with specific antisense sequences reverses the transformed phenotype in ras oncogene-transformed NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3699-3710.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J. & Ullrich, A. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**, 707-712.
- Soule, H.D. & McGrath, C.M. (1980) Estrogen responsive proliferation of clonal human breast carcinoma cells in athymic mice. *Cancer Lett.* **10**, 177-189.
- Soule, H.D., Maloney, T.M., Wolman, S.R., Peterson, W.D., Jr., Brenz, R., McGrath, C.M., Russo, J., Pauley, R.J., Jones, R.F. & Brooks, S.C. (1990) Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res.* **50**, 6075-6086.
- Spicer, D.V., Kreeker, E.A. & Pike, M.C. (1995) The endocrine prevention of breast cancer. *Cancer Invest.* **13**, 495-504.
- Stehelin, D., Guntaka, R.V., Varmus, H.E. & Bishop, J.M. (1976a) Purification of DNAs to the nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. *J. Mol. Biol.* **101**, 349-365.
- Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M. & Vogt, P.K. (1976b) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **260**, 170-173.
- Stein, J.H. (1983) *Medicina interna*. Little, Brown & Co, Boston
- Torres, R., Schreiber-Agus, N., Morgenbesser, S.D. & DePinho, R.A. (1992) Myc and Max: A putative transcriptional complex in search of a cellular target. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **4**, 468-474.
- Valette, A., Gas, N., Jozan, S., Roubinet, F., Dupont, M.A. & Bayard, F. (1987) Influence of 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate on proliferation and maturation of human breast carcinoma cells (MCF-7): relationship to cell cycle events. *Cancer Res.* **47**, 1615-1620.
- van Agthoven, T., van Agthoven, T.L.A., Portengen, H., Foekens, J.A. & Dorssers, L.C.J. (1992) Ectopic expression of EGF receptors induces hormone independence in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Cancer Res.* **52**, 5082-5088.
- Varmus, H. (1989) in *Oncogenes and the molecular origins of cancer* (Weinberg, R.A. ed.), An historical overview of oncogenes. pp. 3-44, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Verma, I.M., Deschamps, J., Van Beveren, C. & Sassone-Corsi, P. (1986) Human fos gene. *Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant. Biol.* **51**, 949-956.
- Vogt, P.K. & Bos, T.J. (1989) The oncogene jun and nuclear signalling. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 172-175.
- Watson, P.H., Pon, R.T. & Shiu, R.P.C. (1991) Inhibition of c-myc expression by phosphorothioate antisense oligonucleotide identifies a critical role for c-myc in the growth of human breast cancer. *Cancer. Res.* **51**, 3996-4000.
- Winkler, M.E., O'Connor, L., Winget, M. & Fendly, B. (1993) EGF and TGF $\alpha$  bind differently to the EGF receptor. *Biochemistry* **28**, 6373-6378.
- Wu, J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, M. & Sturgill, T.W. (1993) Inhibition of the EGF-activated MAPk signaling pathway by cAMP. *Science* **262**, 1065-1069.



**Dr. Alberto Baldi**

Director de tesis



**Lic. Alejandro G. Mladovan**

Tesista

**Tesis para optar al título de Doctor  
de la Universidad de Buenos Aires.**

**Realizada en el Instituto de Biología y Medicina Experimental  
Obligado 2490 (1428). Bs. As., Argentina.**

**Presentada en mayo de 1996**



